

THESIS / THÈSE

LICENCE EN BIOLOGIE

Effet de différentes doses des récepteurs de la Reelin, VLDLR et ApoER2, au cours du développement cérébral

Dejardin, Mathieu

Award date:
2001

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**EFFET DE DIFFÉRENTES DOSES DES GÈNES DES RÉCEPTEURS DE LA
REELIN, VLDLR ET APOER2, AU COURS DU DÉVELOPPEMENT CÉRÉBRAL**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Mathieu DEJARDIN

Juin 2001

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES**

Secrétariat du Département de Physiologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72 42 77 - Téléfax: + 32(0)81.72 42 80

E-mail: Andre.Goffinet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Effet de différentes doses des récepteurs de la Reelin, VLDLR et ApoER2,
au cours du développement cérébral.**

DEJARDIN Mathieu

Résumé

La Reelin est une protéine extra-cellulaire indispensable au développement du système nerveux, principalement au niveau du cortex cérébral, de l'hippocampe et du cervelet. Une mutation de la Reelin entraîne chez la souris le phénotype appelé Reeler, qui altère gravement les diverses structures cérébrales. Deux récepteurs de la Reelin ont été identifiés: il s'agit de VLDLR et de ApoER2, appartenant à la famille des récepteurs LDL. Ces récepteurs captent le signal Reelin et le relaient à l'intérieur de la cellule, via la protéine Dab1, dont le niveau de phosphorylation augmente en présence de Reelin et qui semble jouer le rôle d'un adaptateur entre ces récepteurs et une ou plusieurs kinases intra-cellulaires encore non identifiées. Dans notre travail, nous avons étudié le cerveau de souris possédant un nombre variable d'allèles fonctionnels des récepteurs VLDLR et ApoER2. Nos résultats montrent qu'il existe une redondance entre ces deux molécules, bien que VLDLR et ApoER2 respectivement interviennent plus spécifiquement lors du développement du cervelet et de l'hippocampe. Nous avons aussi démontré un effet de doses des allèles des deux récepteurs

Mémoire de licence en Sciences neurobiologiques

Juin 2001

Promoteur: A. M. Goffinet

I. Introduction

1. Modèle du développement cérébral chez les souris normales.

1.1 La migration neuronale.

1.2 Le développement cérébral.

A. La pré-plaque.

B. L'apparition de la CP.

1.3 Le développement du cervelet.

1.4. Le développement de l'hippocampe.

2. Développement cérébral de type Reeler

2.1. Le cortex.

2.2. Le cervelet.

2.3. L'hippocampe

3. Partenaires moléculaires impliqués dans la migration neuronale.

3.1 La Reelin.

3.2 La superfamille des récepteurs LDLR.

3.3 La Reelin interagit avec VLDLR et ApoER2.

3.4 Pattern d'expression et actions des récepteurs ApoER2 et VLDLR.

3.5 Le récepteur VLDLR chez les ovipares.

3.6 Dab-1.

3.7 La Reelin inhibe la migration neuronal via l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$.

3.8 Les CNRs: les nouveaux membres de la superfamille multigénique des cadhérines.

4. Liens avec la maladie d'Alzheimer.

4.1 La liaison de la Reelin à VLDLR et ApoER2 module la phosphorylation de la protéine Tau.

4.2 Dab-1, comme FE-65 peuvent se lier à l'APP et aux récepteurs LDL.

4.3 Les récepteurs VLDLR et ApoER2 sont capable de lier ApoE qui est présent dans le cerveau.

II. Résultats.

1. Etude du cervelet.

1.1 Le cervelet chez les souris mutantes pour VLDLR.

1.2 Cervelet de souris de phénotype VLDLR -/- ApoER2 +/-.

1.3 Cervelet de souris de phénotype VLDLR -/- ApoER2 -/-.

1.4 Cervelet de souris mutantes pour ApoER2.

1.5 Cervelet de souris de phénotype ApoER2 -/- VLDLR +/-.

1.6 Cervelet de poulet R/O (restricted ovulator).

2. Etude de l'hippocampe.

2.1 L'hippocampe chez les souris mutantes pour ApoER2.

2.2 L'hippocampe chez les souris ApoER2 -/- VLDLR +/-.

2.3 L'hippocampe chez les souris mutantes VLDLR -/- ApoER2 -/-.

2.4 L'hippocampe chez les souris mutantes VLDLR -/- et VLDLR -/- ApoER2 +/-.

III. Discussion.

1. Les récepteurs VLDLR et ApoER2 dans le cervelet.

- 1.1 Le cervelet chez les souris mutantes pour les deux récepteurs.
- 1.2 Rôles communs des récepteurs.
- 1.3 Rôles distincts des récepteurs.
- 1.4 Comment ces récepteurs peuvent-ils avoir des rôles communs et d'autres spécifiques ?

2. Les récepteurs ApoER2 et VLDLR dans l'hippocampe.

- 2.1 La mutation de VLDLR ne s'exprime qu'en absence de récepteurs ApoER2 fonctionnels.
- 2.2 La Reelin est nécessaire à la formation du gradient " inside-out " dans l'hippocampe.
- 2.3 Rôles des récepteurs.
- 2.4 Les trois niveau d'organisation du gyrus.

3. Conclusion

- 3.1. Importance de VLDLR et ApoER2 dans la formation du cerveau.
- 3.2. Rôle des récepteurs dans la migration.
- 3.3. Rôle des récepteurs dans le cervelet et l'hippocampe.

IV. Matériels et méthodes.

V. Bibliographie.

I. Introduction

✦ La **reelin** est une protéine matricielle indispensable au développement du système nerveux, principalement au niveau du cortex cérébral, de l'hippocampe et du cervelet. Une mutation au niveau de la Reelin entraîne chez la souris un phénotype particulier appelé **Reeler**, qui fut décrit voici plusieurs décennies et qui altère gravement les diverses structures cérébrales. Deux de ses récepteurs ont été identifiés: il s'agit de **VLDLR** et de **ApoER2**, tous deux appartenant à la famille des récepteurs LDL.

✦ Ces récepteurs captent le signal reelin et le relaient à l'intérieur de la cellule, probablement via la protéine **Dab-1**, dont le niveau de phosphorylation augmente en présence de Reelin et qui semble jouer le rôle d'un **adaptateur** entre ces récepteurs et une ou plusieurs kinases intra-cellulaires encore non identifiées.

✦ Ce travail se fonde sur l'observation de cerveaux de souris possédant un nombre variable d'allèles fonctionnels de ces récepteurs. Les structures étudiées sont le **cervelet** et l'**hippocampe**. L'objectif est d'une part de vérifier si le phénotype est dose-dépendant, et d'autre part tenter de déterminer la spécificité de fonction de chacun de ces deux récepteurs dans la transmission du signal Reelin.

1. Modèle du développement cérébral chez les souris normales.

1.1 La migration neuronale.

● Lors du développement cérébral, la **migration neuronale** est le mécanisme qui permet le positionnement correct des neurones. Cette migration peut se faire de trois manières, selon l'origine ou la localisation future de la cellule.

● La **migration gliophile**, aussi appelée migration radiale, s'effectue à partir de la VZ contenant les précurseurs neuro-épithéliaux vers la surface piale. Le neurone post-mitotique est au départ apposé à l'épithélium radial qui lui sert de guide, fonction ensuite reprise par les cellules gliales.

● La **migration neuronophile** ou tangentielle fut mise en évidence plus récemment. Elle concerne une minorité de neurones comme par exemple les grains externes du cervelet ou encore les neurones GABAergiques migrant vers le cortex à partir de l'éminence ganglionnaire. Ce type de migration s'effectue parallèlement à la surface piale et donc perpendiculairement aux fibres gliales.

● Un troisième type de migration a été proposé pour décrire la migration à partir de la sVZ vers le bulbe olfactif et la rostrale du télencéphale. Elle fut nommée "**chain migration**". Les neurones concernés semblent se mouvoir à l'intérieur d'un tunnel glial.

● **Au niveau cellulaire**, trois événements principaux expliquent la migration :

- La migration est initiée au pôle rostral de la cellule par la formation de protrusions et de **plaques d'adhérence** au niveau des extensions dendritiques. Ce phénomène est médié par des GTPases de la famille Rho qui régulent la polymérisation et l'organisation des filaments d'actines.
- Les **forces contractiles** impliquant les microtubules agissant en dessous du pôle leader conduisent au mouvement du corps cellulaire et du noyau.
- Les **plaques d'adhésion** sont retirées à l'arrière de la cellule.

1.2 Le développement cérébral.

☼ Le principal contingent de cellules du cortex cérébral est la **plaque corticale**, qui apparaît vers E13,5-E14 (14ème jour embryonnaire). A ce stade, **six couches** concentriques forment le mur télencéphalique. Du ventricule vers la surface piale, il s'agit de la zone ventriculaire (**VZ**), la zone subventriculaire (**svZ**), la zone intermédiaire (**IZ**), la plaque sous-corticale (**sCP**), la plaque corticale (**CP**), et la zone marginale (**MZ**).

☼ La **VZ** comprend les précurseurs neuro-épithéliaux, des cellules en interphase qui s'étendent radialement, ainsi que des cellules en mitose restant attachées autour du ventricule.

☼ La **svZ** donne naissance aux cellules gliales qui servent de guides aux neurones corticaux en migration. La **svZ** produit aussi une génération tardive de neurones qui migrent tangentiellement par rapport à l'**IZ**. Celle-ci est traversée par des neurones immatures en migration, le plus souvent radiale.

✿ A. La pré-plaque.

✿ Avant la formation de la **CP**, vers E12, une première génération de neurones post-mitotiques forment au niveau de la **MZ** un réseau lâche appelé **pré-plaque** qui est divisé en deux lors de l'apparition de la **plaque corticale**. A ce stade, la **MZ** comporte des cellules de **Cajal-Retzius** reelin positives, et des cellules pionnières reelin négatives, tandis que la **sCP** comporte des neurones qui formeront ultérieurement les couches **I** et **VIb** du cortex.

✿ B. L'apparition de la CP.

✿ La majorité des **neurones post-mitotiques** générés par la **VZ** sont des neurones glutamatergiques qui migrent radialement pour former, en fin de migration, les couches corticales **II** à **VIa**, séparant ainsi la pré-plaque en deux parties dont l'externe forme la couche **I** et l'interne la couche **VIb**. Une minorité de neurones, destinés à former des interneurones inhibiteurs **GABAergiques**, sont issus du pôle rostral de l'hémisphère et de l'éminence ganglionnaire médiane, et gagnent le cortex par migration tangentielle.

✿ Les neurones formant la **CP** se positionnent après migration selon un gradient **inside-out**, c'est-à-dire que les neurones plus jeunes traversent les couches préalablement établies avant de se détacher des fibres gliales et de s'installer. Ainsi, à l'âge adulte, les neurones générés au début du développement se trouvent dans les zones profondes tandis que ceux qui sont générés tardivement se situent dans des couches plus superficielles (I. Bar 2000).

✿ Ceci a été démontré grâce au **marquage des neurones en mitose** à E12 et à E15, que l'on a observé à P16. Chez les souris normales, les neurones marqués à E12 se retrouvent dans les couches profondes, tandis que les neurones générés à E15 se retrouvent dans les couches superficielles.

✿ Les neurones de la **CP** sont parallèles entre eux et orientés radialement. Par contre, chez les souris présentant le phénotype **Reeler**, les neurones générés à E12 sont dispersés dans le cortex selon un gradient : leur densité est maximale dans la couche **I**, juste au-dessous de la surface piale, alors que cette couche est normalement pauvre en cellules, puis la densité diminue au fur et à mesure que l'on s'enfonce dans le cortex. Les neurones générés à E15 migrent et s'établissent dans les couches profondes (M. Trommsdorff 1999).

1.3 Le développement du cervelet.

☼ Le cervelet est composé de **deux types de substance grise** : un groupe de noyaux interne et un cortex externe. Les différents types de cellules du cortex sont arrangés en couche. La **couche moléculaire** est séparée de la **couche granulaire** sous-jacente par la **couche de Purkinje**. Au-dessous se trouve la **substance blanche**. Au début de son développement, le cervelet contient **deux couches** de cellules **prolifératives** : une interne et une externe. Ces couches germinales sont soumises à des divisions cellulaires hautement régulée.

☼ La **couche germinale interne** produit les neuroblastes nucléaires primitifs, qui migrent pour former les noyaux profonds. Cette couche produit aussi les précurseurs des cellules de Purkinje, qui s'aligneront après **migration radiale** au-dessous de la couche germinale externe.

☼ La **couche germinale externe** effectue trois vagues de prolifération successive pour produire les grains et les cellules de la couche moléculaire. Les grains effectuent une **migration neuronophile** vers les noyaux profonds pour former la couche granulaire.

1.4. Le développement de l'hippocampe.

● L'hippocampe est une **structure laminaire** qui résulte d'un processus de formation complexe. Au stade précoce de son développement (E13-E14), l'hippocampe est formé d'une **couche plexiforme** primitive qui contient les premières cellules de la future **couche moléculaire** comprenant entre autres des cellules de **Cajal-Retzius** Reelin positive

● Vers E15 cette couche est séparée par l'insertion de **cellules pyramidales** se répartissant selon un gradient « **inside-out** ». La partie supérieure de la sous-plaque formera la **substance blanche** tandis que la partie inférieure formera la **couche moléculaire** (K. Nakajima et al. 1997).

2. Développement cérébral de type Reeler

■ Les mutations spontanées du gène **Reelin** perturbent le développement cérébral. Des anomalies apparaissent dans la majeure partie du cerveau et altèrent surtout le **cortex**, l'**hippocampe** et le **cervelet**. Ce phénotype est identique à celui obtenu par la mutation de **Dab-1**, la double mutation des récepteurs **VLDLR** et **ApoER2**, et ressemble quelque peu au phénotype induit par les mutations de **Cdk5** ou **p35** (M Trommsdorff et al., 1999).

2.1. Le cortex.

■ Dans le cortex, le phénotype **Reeler** est détectable dès que la CP se forme, c à d vers **E14**. La **pré-plaque** n'est pas morphologiquement anormale, mais **ne se divise pas**, de sorte que toutes les cellules de la pré-plaque ne forment qu'une couche superficielle appelée « **superplaque** » (sP), tandis que les neurones qui devraient normalement former la CP s'accumulent au-dessous de la sP de manière désordonnée.

■ Ces derniers sont plus courts, moins strictement radiaux et forment un réseau moins dense par rapport au phénotype normal. Les cellules sont **générées au bon moment** et leur programme intrinsèque de **différentiation** en différentes classes cellulaires est **préservé**, mais les neurones se déposent progressivement à des niveaux de plus en plus profonds, à l'inverse de ce qu'ils font chez l'animal normal (I. Bar et al. 2000).

2.2. Le cervelet.

■ Dans le cervelet, les **cellules de Purkinje** ne parviennent pas à migrer et restent agglomérées autour des neurones des **noyaux profonds** cérébelleux où leur arborisation dendritique est anormale. En conséquence, les grains, dont la prolifération dépend des cellules de Purkinje, ne migrent pas. Il en résulte une **réduction de la taille** du cervelet accompagnée d'une **diminution de la foliation**. Dans ce cervelet rudimentaire, les cellules de Purkinje ont une différenciation anormale.

Figure 1'

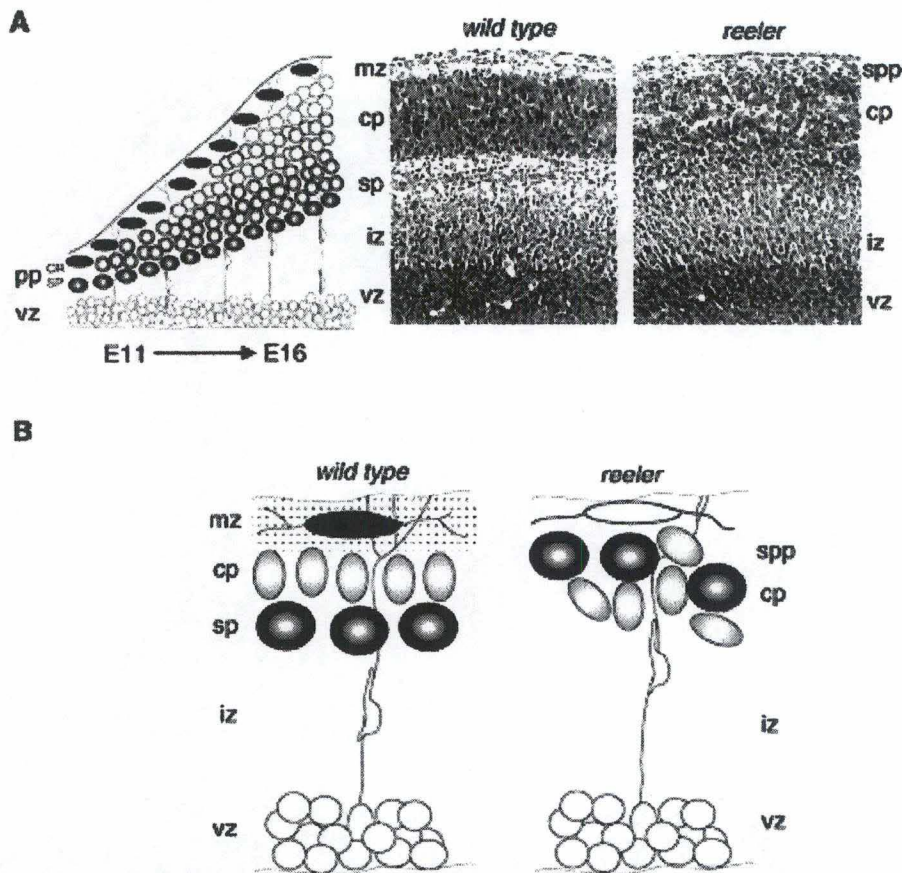


Figure 1' : Vue simplifiée de la corticogénèse et de l'apparence histologique du développement cérébral. (A) La corticogénèse chez les mammifères commence avec l'apparition de la pré-plaque (pp), qui est localisée au dessus de la zone ventriculaire (vz). La pré-plaque se forme vers E11-E12 chez les souris et contient les cellules de Cajal-Retzius (CR) et les neurones de la sous-plaque entre autre. Les cellules de la plaque corticale sont générées durant la semaine suivante. Le premier contingent de cellules corticales (gris) migre au-delà de la sous-plaque et s'arrête juste en-dessous des cellules de Cajal-Retzius. Vers E16,5, les neurones les plus jeunes sont disposés au-dessus des plus vieux, à l'exception des cellules de Cajal-Retzius. Chez les souris *reeler*, la plaque corticale est désorganisée. Beaucoup de neurones de la sous-plaque sont localisés avec les cellules de Cajal-Retzius dans une région dense appelée super-plaque. (B) Dans un cortex normal, le premier contingent de cellules de la plaque corticale se positionnent entre les cellules de Cajal-Retzius et la sous-plaque. Chez les *reeler*, le premier contingent de cellules de la plaque corticale ne migrent pas au-delà de la sous-plaque et s'accumulent de manière désorganisée dans la super-plaque.

2.3. L'hippocampe

Au niveau de l'hippocampe, les **cellules pyramidales et granulaires** ne se positionnent pas correctement, et sont rassemblées dans un **pattern peu reconnaissable**. La **couche pyramidale est dédoublée** voir détriplée. Le **gyrus dentelé** est formé d'un **amas de grains** sans organisation précise.

3. Partenaires moléculaires impliqués dans la migration neuronale.

3.1 La Reelin.

⊙ La Reelin est une protéine **matricielle** sécrétée par les cellules de **Cajal-Retzius** dans le **cortex** et l'**hippocampe** ainsi que par d'autres neurones dans d'autres parties du cerveau, comme les cellules de la **couche granulaire** externe du cervelet. L'**expression** du mRNA est **maximale** pendant les **stades précoces** de développement. Vers **E14**, le signal se trouve dans les cellules de **Cajal-Retzius** de la **MZ**, mais le gène n'est **pas exprimé** dans la **CP précoce**, qui est pourtant la structure principalement touchée par la mutation *Reeler*. A la naissance, le signal diminue, mais reste maximal dans la **MZ** tandis qu'un faible signal apparaît dans le ruban cortical et se déplace dans les couches corticales, principalement la **V** et la **VI**. Chez la souris adulte, le mRNA de la Reelin se trouve dans les interneurons corticaux (I. Bar et al. 2000).

⊙ Ce mRNA composé de **11 629** nucléotides, dont **10 383** de phase ouverte de lecture, encode une protéine de **3461** acides aminés et d'un poids moléculaire prédit de **388** kDa. La taille réelle de la Reelin est estimée à **400-450** kDa, probablement en raison de glycosylations.

⊙ Le polypeptide contient un peptide **signal N-terminal** permettant sa **sécrétion**, suivi d'une séquence d'environ 250 acides aminés présentant 25% d'homologie avec la **F-spondine**, une protéine extra-cellulaire qui contrôle l'adhésion et l'extension des axones commissuraux dans la moelle épinière. Ensuite vient une région qui ne ressemble à rien de connu et qui est appelé **segment unique**. Plus loin dans la séquence, on trouve une série de **huit motifs** répétés de 350 à 390 acides aminés chacun. Ces huit motifs sont composés de **deux parties** assez similaires séparées par un motif **EGF-like** d'une trentaine d'acides aminés.

⊙ Ces motifs EGF-like présentent beaucoup de similarités entre eux ainsi qu'avec les motifs EGF de plusieurs protéines de matrice tel que l'intégrine β . La séquence **C-terminale** est composée de 33 acides aminés, surtout des résidus **basiques** (I. Bar et al. 2000). Cette séquence chargée est essentielle pour la sécrétion de la protéine (N. Utsunomiya-Tate et al. 2000)

Figure 2'

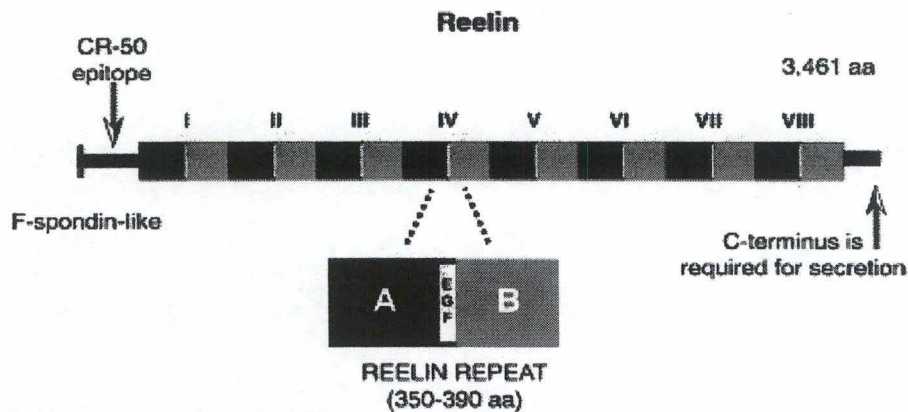


Figure 2' : La Reelin est une protéine de 3461 acides aminés et d'un poids moléculaire d'environ 385 Kda. La Reelin contient un peptide signal N-terminal clivable, suivi d'une région similaire à la F-spondine et des huit répétitions internes de 350-390 acides aminés. Ces répétitions contiennent deux sous-domaine, A et B, séparés par un motif EGF-like. L'anticorps CR-50 reconnaît l'épitope compris entre les acides aminés 230 et 346 et bloque la fonction Reelin *in vivo*.

⊙ Le **gène** de la Reelin mesure plus de **400kb**, mais cette grande taille est en majeure partie due à la présence d'**introns**. Le premier est estimé à 80-100kb, et plusieurs autres aux alentours de 10 à 20 kb. La protéine est composée de **65 exons** dont 51 ne servent à encoder que les huit répétitions. Le premier exon contient une région non traduite, le codon d'initiation, le peptide signal et une partie du domaine F-spondine. Le reste de ce domaine ainsi que le segment unique sont encodés par les exons 1 à 12 et une partie de l'exon 13. Les huit répétitions sont chacune encodées par cinq à sept exons. Les deux derniers exons sont un micro-exon de six nucléotides, et l'exon terminal.

⊙ Dans le cerveau, environ 10 % des mRNA ne comporte pas le micro-exon suite à un **épissage alternatif**, tandis que dans les reins ou le foie, cette forme alternative est prédominante. Un **second épissage alternatif** résulte de l'utilisation d'un site de **polyadenylation alternative** et concerne 10 à 25% de tout les mRNA. Cette polyadenylation alternative introduit deux codon stop juste après l'exon 63 et provoque l'absence de la séquence polybasique (I. Bar et al. 2000).

⊙ L'**anticorps CR-50** dirigé contre la **Reelin** a été produit en immunisant des souris *Reeler* avec un homogénat de cerveau normal. Cet anticorps qui marque les cellules de Cajal-Retzius a permis d'isoler la Reelin. Son **épitope** est localisé du côté **N-terminal** entre les résidus 230 et 346. Cette anticorps **bloque la fonction biologique de la Reelin**, ce qui se traduit entre autre par une sévère **diminution** du niveau de **phosphorylation de Dab-1**, une protéine adaptatrice.

⊙ Récemment, on a démontré que la **Reelin** s'assemblait et formait de grands complexes aussi bien *in vivo* que *in vitro*. Cette **polymérisation** se fait par des interactions électrostatiques homophiles au niveau de l'**épitope CR-50**, et est inhibée par cet anticorps. Comme cet anticorps dépolymérise la Reelin à des concentrations comparables à celles pour lesquelles il inhibe la phosphorylation de Dab-1, cela suggère que la formation de complexe par la Reelin est **indispensable** à sa fonction. D'ailleurs, lorsque l'épitope CR-50 est changé par un "FLAG tag", on n'observe ni la polymérisation, ni l'induction de la phosphorylation de Dab-1. Sous sa forme polymérisée, la **Reelin** pourrait agir comme un **ligand multivalent** et induire la **polymérisation de ses récepteurs**, et Dab-1 serait **transphosphorylé** grâce au recrutement de protéines kinases (N. Utsunomiya-Tate et al. 2000).

3.2 La superfamille des récepteurs LDLR.

◆ La superfamille des récepteurs **LDLR** est caractérisée par des **éléments de structure communs** aux cinq membres. Ces éléments montrent un degré d'identité élevé parmi une large catégorie d'espèce (70-100%). Une telle **conservation** dérive probablement de l'évolution d'un gène ancestral par duplication et/ou " exon shuffling ". Comme structure conservée, on trouve des **répétitions** extra-cellulaires directs de type A (**LA**), aussi connues comme répétitions LDLR de liaison au ligand.

◆ Ces séquences d'environ 40 résidus contiennent chacune **six cystéines** formant des ponts dissulfures, et des sites de liaison pour le calcium. Le **nombre** de répétition LA et leur **arrangement** spécifique en cluster déterminent la **spécificité** de liaison du ligand, liaison pour laquelle le calcium est nécessaire. En amont et/ou en aval de ces séquences se trouvent des **répétitions** de type " epidermal growth factor (EGF) precursor (**EG**)", contenant aussi **six cystéines** chacune. Ensuite viennent les **répétitions YWTD** de plus ou moins 40 résidus et qui sont généralement entouré de séquences EG. Enfin, il y a un domaine de **O-glycosilation**, un court **segment transmembranaire** d'environ 20 résidus, et au moins un motif d'internalisation cytoplasmique **NPxY** sur chacun des membres (W. J. Schneider et al. 1997).

◆ Les **membres** de cette superfamille sont au nombre de **cinq** : LDLR, LDLR related protein (LRP), VLDLR, Megalin et ApoER2.

✕ LRP contient 31 séquences LA organisées en quatre clusters de 2, 8, 10 et 11 séquences. Il intervient dans divers processus tel que le métabolisme des lipoprotéines et l'homéostasie des protéinases extra-cellulaires qu'il est capable d'internaliser.

✕ Chez **Megalin**, les 36 séquences LA sont organisées en clusters de 7, 8, 10 et 11. Sa fonction est moins bien connue, mais il semble qu'il intervienne dans l'homéostasie du cholestérol fœtal.

✕ Les séquences LA de **LDLR**, **VLDLR** et **ApoER2** sont organisées en un cluster unique de 7, 8 et 7 ou 8 respectivement. Une autre nomenclature de ces molécules est basée sur le nombre de séquences LA. Ainsi, VLDLR s'écrit aussi LR-8 (LDLR related protein avec 8 répétitions LA), ApoER2 LR-7/8B, et LRP LR-11 car il possède un cluster de 11 LA (J. Nimpf et W. J. Schneider 1998).

Figure 3'

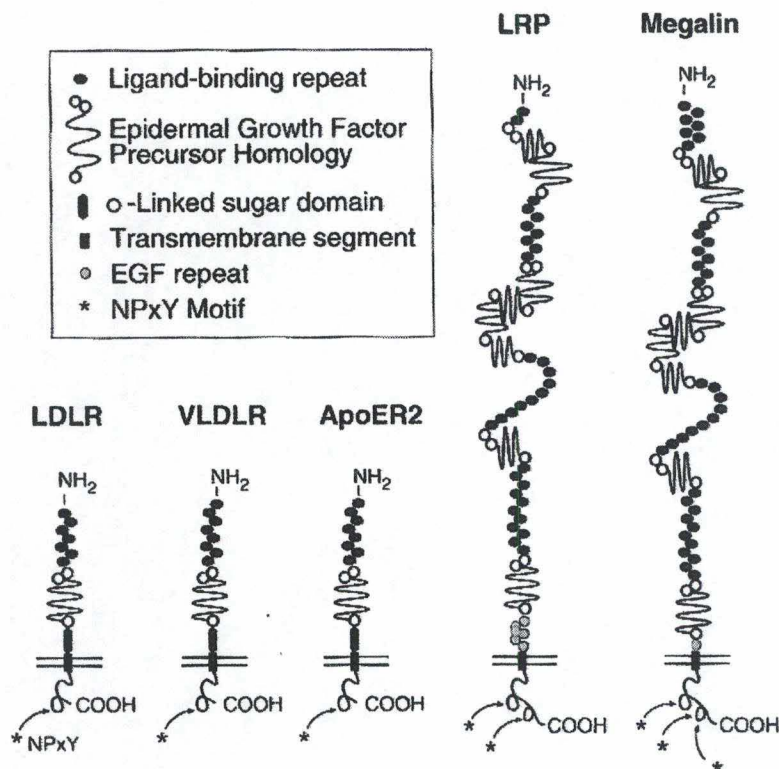


Figure 3' : Organisation structurale des récepteurs de la famille LDL. Le motif NPxY qui sert de signal d'endocytose et de site d'interaction protéique est indiqué par une astérisk.

◆ Alors que **LRP** et **LDLR** sont exprimés dans la plupart des cellules et notamment dans le **foie**, l'expression de **VLDLR** est nulle dans le foie. Son niveau d'expression dans les différents tissus varie selon les espèces, mais le **cœur**, les **muscles squelettiques** et les **tissus adipeux** sont les sites prédominants chez tout les mammifères, les sites mineurs étant les ovaires, les reins et le placenta (J. Nimpf et W. J. Schneider 1998). Au niveau du **cerveau**, VLDLR est exprimé dans les **microglies**, dans certaines sous-population de **neurones pyramidaux** et dans le **cervelet embryonnaire** surtout. LDLR y est exprimé dans les neurones et les cellules gliales, et LRP dans les neurones, les astrocytes activés et le plexus choroïde, tandis que l'expression de Megalin y est limitée aux épendimocytes.

◆ L'expression de **ApoER2** est élevée dans les **neurones pyramidaux** du cortex et de l'hippocampe, les **cellules de Purkinje**, mais comparativement au cerveau et aux autres organes, son expression est plus forte dans les testicules (communications personnelles).

3.3 La Reelin interagit avec VLDLR et ApoER2.

✿ Dans le cerveau les récepteurs **VLDLR** et **ApoER2** sont capables de **lier** la **Reelin**. En outre **VLDLR** **internalise** une partie. Dans ce dernier cas, la Reelin se retrouve associée à des structures vésiculaires à l'intérieur des neurones.

✿ La fonction première de VLDLR et ApoER2 semble différente de celles des autres membres de la famille LDLR. D'abord, **VLDLR** et **ApoER2** sont exprimés dans plusieurs types de tissus, comprenant le **cerveau**, mais **pas** dans le **foie**, alors que les autres récepteurs LDL y sont exprimés de manière **prédominante**. Ensuite, ces deux récepteurs ont une **faible affinité** pour les **particules VLDL** et ne lient pas les **particules LDL** (G. D'Arcangelo et al. 1999).

✿ De récents travaux réalisés au laboratoire ont montré que les **domaine liaison** de la **Reelin** étaient les mêmes pour les deux **récepteurs**. Il s'agit des domaines répétés **trois à six** compris dans la région central

✿ **VLDLR**, **ApoER2** et **Dab-1** sont **co-exprimés** dans le cerveau **adulte**, mais le taux de phosphorylation de Dab-1 y est beaucoup moins élevé que dans un cerveau embryonnaire. Il est possible que **voie** de transduction **Reelin** reste légèrement active pour **guider les neurones** qui continuent à naître.

☞ Alternativement, cette voie pourrait intervenir dans la **réorganisation** des **connexions dendritiques et axonales**, hypothèse appuyée par la nécessité de VLDLR et ApoER2 pour l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje, et qui va de pair avec une éventuelle réorganisation du cytosquelette (M. Trommsdorff et al. 1999).

3.4 Pattern d'expression et actions des récepteurs ApoER2 et VLDLR.

☞ Au niveau du **cortex** embryonnaire, ces deux récepteurs commencent à être exprimés vers **E13,5**. **ApoER2** est abondamment exprimé dans les neurones post-mitotiques qui ont quitté la zone ventriculaire et qui sont en route vers ou qui sont déjà arrivés à destination. On le retrouve donc **partout** dans le cortex pendant le développement embryonnaire. **VLDLR** a un pattern d'expression semblable à celui de **Dab-1** et beaucoup plus restreint que celui de ApoER2 : il est limité aux couches adjacentes aux cellules de Cajal-Retzius exprimant la Reelin, dans la **MZ**.

☞ Dans le **cervelet** embryonnaire, ces **deux récepteurs** sont exprimés à partir de **E15,5**. Ils sont exprimés avec **Dab-1** dans les **zones profondes** où les **cellules de Purkinje** résident à ce moment.

☞ Dans l'**hippocampe**, les **deux récepteurs** sont co-exprimés avec **Dab-1** vers **E13,5**. **ApoER2** a une expression **plus large** que **VLDLR**. (M. Trommsdorff et al. 1999)

☞ Chez les souris ne possédant **pas de ApoER2** fonctionnel, les anomalies se marquent surtout au niveau du **cortex** et de l'**hippocampe**. Les **couches** composant ces structures semblent d'ailleurs **partiellement inversées** comme chez les souris *Reeler*. Ceci a été mis en évidence grâce au marquage des neurones en mitose à E12 et à E15, que l'on a observé à P16

☞ Au niveau du **cervelet**, c'est le récepteur **VLDLR** qui est le plus important : chez les souris **VLDLR -/-**, les cellules de Purkinje forment des **aggrégats** et la foliation est anormale, alors que le cervelet de souris **ApoER2 -/-** est à peu près **normal**. Les caractéristiques cérébelleuses des souris **VLDLR -/-** se retrouvent chez les souris *Reeler* de manière encore plus prononcées (M. Trommsdorff et al. 1999).

3.5 Le récepteur VLDLR chez les ovipares.

Il existe chez les espèces **ovipares** une protéine présentant une forte homologie avec **VLDLR**. Elle a été clonée chez **Xenopus** et chez le **poulet**. Contrairement à son orthologue mammalien, la **fonction** de VLDLR chez les ovipares est bien **connue**. Chez les **poules** matures, de grandes quantités de **précurseurs du jaune d'œuf** sont synthétisées dans le foie sous le contrôle d'oestrogènes, amenés via la circulation aux ovaires, puis aux **oocytes** en croissance pour former le jaune. Ce processus est la **vitellogénèse** et est indispensable à la reproduction de ces espèces, car le développement de l'embryon dépend des réserves contenues dans le jaune.

Les **précurseurs** majeurs du jaune sont les **particules VLDL** et la **vitellogénine (VTG)** qui sont internalisées par **endocytose médiée** par un récepteur. Ces deux macromolécules se lient au même récepteur de 95 kDa qui est fortement exprimé dans l'oocyte : **VLDLR**. Les sites de liaison de VLDL et VTG sur ce récepteur ont des propriétés similaires, mais semblent cependant distincts.

Ce récepteur est spécifique de **ApoB**, une apolipoprotéine, lorsque celle-ci est intégrée aux particules VLDL. Mais il ne **lie pas ApoII**, la seule autre apolipoprotéine majeure présente dans les particules VLDL. VLDLR permet aussi d'**internaliser** dans le jaune les **vitamines** via la riboflavin binding protein (**RiBP**) qui forme des complexes avec VTG dans le plasma, complexes reconnus par VLDLR. VLDLR ne lie pas seulement VLDL et VTG, mais transporte aussi une variété de composants mineurs du jaune d'œuf telle que l' α 2-Macroglobuline (α 2M). Chez les mammifères, cette protéine (α 2M) a pour fonction principale de lier les protéinases présentes dans la circulation et de les dégrader dans le foie.

La **disruption** du récepteur **VLDLR** entraîne le phénotype **R/O** (restricted ovulator) caractérisé par une **hyperlipidémie** et la **stérilité** des femelles et résulte d'une mutation dans le gène qui est porté sur un locus du chromosome Z (les femelles hétérogamétiques ont un chromosome W et un Z tandis que les mâles homogamétiques ont deux Z). Chez les femelles, les oocytes n'accumulent pas de jaune, et n'arrivent donc pas à maturité.

Chez l'**homme**, le ligand majeur de **VLDLR** est **ApoE**. Cependant, ApoE n'existe pas chez le **poulet**, où le ligand majeur de **VLDLR** est **VTG**, qui est absent chez les mammifères. Il serait intéressant de déterminer si les fonctions de ApoE et VTG sont totalement différentes ou si elles se recoupent en partie (J. Nimpf et W. J. Schneider 1998).

3.6 Dab-1.

◆ Le gène disabled-1 (**Dab**) fut initialement découvert chez la **drosophile** où il est " **tyrosine phosphorylé** " pendant le **développement** du SNC, probablement par la tyrosine kinase dAbl avec laquelle dDab est co-localisé (B. W. howell et al. 2000).

◆ Chez la **souris**, la **mutation** du gène codant l'orthologue mammalien **mDab-1** provoque un phénotype identique au phénotype **Reeler**. Ce gène produit au moins quatre protéines de 555, 271, 217 et 555* acides aminés. La forme prédominante de Dab-1 est **p80**, qui semble correspondre à l'**isoforme 555**.

◆ Cette isoforme, transcrite du gène mammalien **mDab-1**, possède 52% d'identité avec son **orthologue** au niveau des 136 résidus situés à l'extrémité N-terminal. Il existe deux autres zones d'homologie de 73 et 33 résidus. Le gène codant cette protéine se trouve sur le **chromosome 4** chez la **souris** et dans la région **p31-32** du **chromosome 1** chez l'**homme** et est exprimé dans le **cerveau** et les **cellules sanguines** (Brian W Howell 1997). Toutes les isoformes de Dab-1 peuvent lier les **phospholipides**, ainsi que le motif **NPxY** de certains membres de la **famille LDLR** et de l'**APP** (amyloïde precursor protéine) via son domaine **PI/PTB** (protein interaction/ phosphotyrosine binding domain). Ce domaine d'interaction se trouve à l'extrémité **N-terminal** et est fortement conservé dans les quatre isoformes identifiées (B. W. howell et al. 2000).

◆ Ce domaine **PTB** se trouve sur d'autres protéines telles que **Shc** ou **FE-65**. Son homologie structurale avec les domaines **pleckstrin** lui permet de lier les **phosphoinositides** avec beaucoup de spécificité. Chez **Shc**, la liaison d'un phospholipide l'empêche de lier un peptide. Ce n'est pas le cas pour **Dab-1**. La liaison du domaine **PTB** de **Dab-1** aux phosphoinositides membranaires pourrait assister la liaison à une protéine membranaire telle que **APP** ou **VLDLR**. Curieusement, en fonction de la protéine qui le porte, ce domaine reconnaît soit les séquences **NPxY phosphorylées** (**Shc**), soit non- phosphorylées (**Dab-1**, **FE-65**). Ainsi, l'affinité de **Dab-1** pour l'**APP** diminue de 250 fois lorsque son motif **NPxY** est phosphorylé. Cependant, les ligands de **Shc** ne sont pas reconnus par **Dab-1** car l'affinité de liaison dépend aussi de la séquence entourant le motif **NPxY** (B. W. howell et al. 1999).

Figure 4'

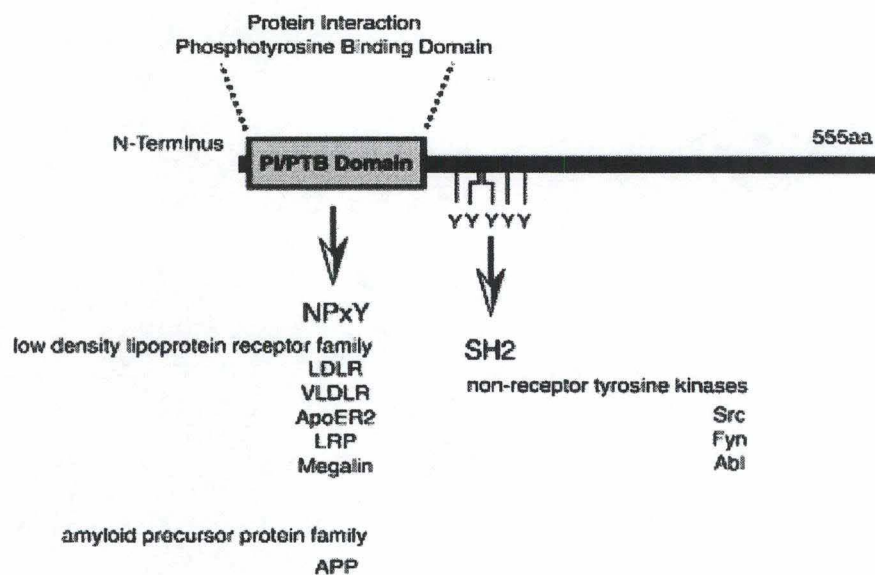


Figure 4': La protéine Dab-1 montre des propriétés de protéine adaptatrice. Près de son extrémité N-terminal se trouve le domaine PI/PTB qui lie le motif NpxY contenu dans différentes protéines dont les récepteurs LDL et l'APP. Un groupe de tyrosine (Y) sert de site de liaison pour les protéines à domaine SH2 tel que les « non-receptor tyrosine kinase » Src, Fyn et Abl.

◆ Au niveau sub-cellulaire, **Dab-1** est surtout localisé dans le **soma** des cellules. Il se trouve aussi dans les **axones** associés à de petites particules où il est **co-localisé** avec l'**APP**. Ces données laissent peu de doute sur une **interaction** potentielle en condition favorable (B. W. howell et al. 1999).

◆ **Dab-1** est " **tyrosine phosphorylé** " pendant le **développement embryonnaire**. Plusieurs sites de phosphorylation potentiels ont été identifiés. Bien que la **Reelin** induise cette **phosphorylation**, il existe un taux de **phosphorylation basal** de Dab-1 chez les souris **Reeler**. Ceci suggère qu'il existe une phosphorylation de Dab-1 indépendante de la Reelin.

◆ La **Reelin** possède un deuxième effet sur **Dab-1** : elle **diminue sa concentration** ou du moins, l'absence de Reelin l'augmente. Il existe deux hypothèses sur ce sujet.

✕ La première suppose une **uprégulation** de l'expression de Dab-1 pour tenter de limiter les conséquences de l'absence de Reelin. Cette uprégulation se ferait au niveau de la **traduction**, car bien que la concentration de cette protéine augmente, celle de son mRNA reste stable (B. W. howell et al. 2000).

✕ La seconde fait intervenir la capacité endocytotique des récepteurs LDL : la **Reelin** induirait la **dégradation** de Dab-1 lors de son **internalisation** (L. Keshvara et al.2001), ce qui expliquerait son accumulation dans les neurones ectopiques chez les souris **Reeler** (G. D'Arcangelo et al. 1999).

◆ *In vitro*, la kinase **Src** phosphoryle les **tyrosines 185,198,200, 220 et 232** situées juste en aval du domaine PTB. Chez les souris exprimant une forme mutée de Dab-1 où ces cinq **tyrosines** ont été remplacées par des **phénylalanines**, on observe le phénotype **Reeler**. De plus, cette forme mutée n'est plus phosphorylée par Src.

◆ De récents travaux ont montré que les sites majeurs de **phosphorylation** induite par la **Reelin** sont les tyrosines **198 et 220**, qui sont aussi les sites majeurs de phosphorylation par Src. La tyrosine 198 fait partie d'une séquence homologue au site de liaison de Src sur le récepteur du PDGF. Cela suggère qu'une fois ce site phosphorylé, il intervient dans le recrutement de protéines kinases à domaine **SH2**. Ces kinases pourraient phosphoryler d'autres protéines associées à Dab-1, ou amplifier le signal Reelin en augmentant le niveau de phosphorylation de Dab-1. Alternativement, la phosphorylation de Dab-1 pourrait moduler la stabilité d'interaction avec les récepteurs LDLR (L. Keshevara et al. 2001).

3.7 La Reelin inhibe la migration neuronal via l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$.

Les **intégrines** sont des récepteurs **transmembranaires** qui relient la matrice extracellulaire au cytosquelette. Elles possèdent des **fonctions** démontrées dans la **migration** et l'**adhésion** cellulaire de beaucoup de types de cellules, y compris les neurones. Chez les souris **mutantes** pour l'**intégrine $\alpha 3 \beta 1$** , on observe une **lamination corticale anormale** qui semble résulter d'un déficit migratoire le long des fibres gliales.

In vitro, lorsqu'on **bloque la fonction** de cette intégrine avec un anticorps, on observe le **détachement** des neurones en migration des **fibres gliales**. La mutation de cette intégrine se marque de trois manières.

Les préférences d'adhésion **gliophiles** des neurones corticaux de ces souris semblent être changées en préférences **neuronophiles**.

Sur des neurones en culture, cette déficience mène à une **réduction** de l'expression de la protéine **Dab-1** d'environ **50 %** et à une **surexpression** d'un **fragment de Reelin** de 180 Kda d'un facteur quatre à sept.

Il en résulte une **déficience de la fonction Reelin**, aussi bien *in vitro* que *in vivo*.

Sur des neurones en culture, le changement de préférence d'adhésion induit par la **Reelin** se traduit par une **diminution** du taux de **migration** des neurones de plus de 60 %, et par le **détachement** de plus de 40 % des neurones de leurs **guides** gliales. Lorsque de la Reelin est injectée dans le mur cérébral au niveau de la zone intermédiaire à E17, division du cerveau où presque tous les neurones migrent activement et qui est loin de la Reelin endogène, la plupart des neurones ne migrent pas au-delà de la Reelin injectée. Cela n'est pas observé chez les souris mutantes pour l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$, suggérant qu'elle est indispensable pour l'inhibition de la migration induite par la Reelin.

Cette inhibition n'a pas lieu non plus en présence de l'anticorps CR-50. Chez les souris **Reeler**, chez qui l'induction de ce changement ne peut se faire de par l'absence de Reelin, on observe l'**apposition persistante** des neurones corticaux sur les fibres gliales.

Figure 5'

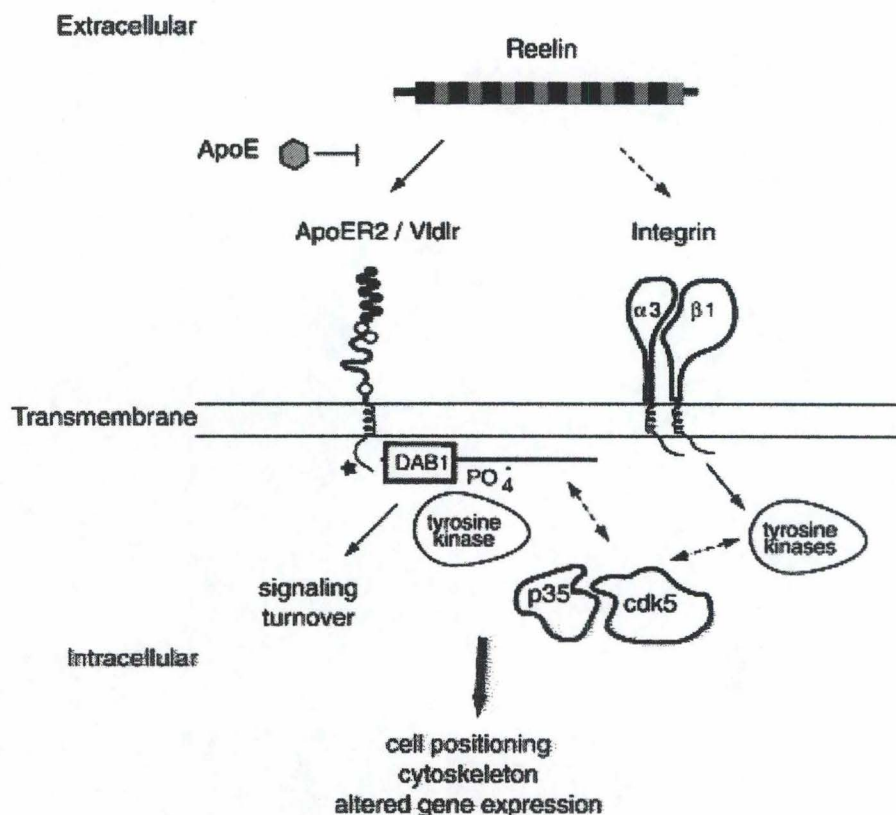


Figure 5' : Modèle de la voie de signalisation Reelin. La Reelin, une protéine extra-cellulaire localisée dans les neurones, lie les récepteurs LDL, VLDLR et ApoER2. Dab-1 est un adaptateur qui lie les motifs NpxY (étoile) du domaine cytoplasmique de ces récepteurs. La liaison de la Reelin au récepteurs induit la phosphorylation de dab-1 en activant une/des « tyrosine kinase(s) ». La Reelin est internalisée par les récepteurs VLDLR et ApoER2, induisant la dégradation de Dab-1. La Reelin lie l'intégrine α3β1 qui recrute des kinases de signalisation. La voie de signalisation Reelin aboutit à l'activation de Cdk5-p35, et induit le positionnement cellulaire et le réarrangement du cytosquelette.

➤ L'augmentation de l'expression d'un **fragment** de 180 KDa chez les souris mutantes peut s'expliquer de deux manières.

✗ L'**intégrine α3β1** pourrait **inhiber** la dégradation de la Reelin en inhibant une **métalloprotéinase** qui clive la Reelin. Des candidats attractifs sont les protéinases de la famille **ADAMs**, laquelle possède des sites de liaison aux intégrines.

✗ L'**interaction** potentielle entre l'**intégrine α3β1** et ce fragment de Reelin pourrait promouvoir la **clearance** de ce fragment. Bien que ce phénomène ne soit pas encore clair, la **surexpression** de ce fragment de Reelin peut expliquer les aberrations de la **lamination corticale** chez les souris déficientes pour cette intégrine. La **diminution de concentration** de la protéine **Dab-1** peut aussi être expliquée par l'augmentation du fragment de Reelin, la Reelin ayant la propriété de diminuer la concentration de Dab-1.

➤ Lorsque l'on met de la **Reelin** sur des tranches de neurones en développement, qu'ils soient normaux ou mutants pour l'intégrine α3β1, on peut mesurer une augmentation du niveau de **phosphorylation de Dab-1**. Cette augmentation n'est pas observée en présence de la protéine RAP, un inhibiteur de la liaison des ligands aux récepteurs de la famille LDL. Ces données prouvent que la phosphorylation de Dab-1 n'est pas **médiée** par l'intégrine α3β1 mais bien par les récepteurs **VLDL** et **ApoER2** (L. Dulabon et Al.).

3.8 Les CNRs: les nouveaux membres de la superfamille multigénique des cadhérines.

✦ Les **CNRs** ont été découvertes en étudiant l'activité de liaison de **Fyn**, une protéine kinase de la famille **Src**. Fyn est une tyrosine kinase qui a un rôle **crucial** lors de la formation des **réseaux neuronaux** du cerveau. Elle est accumulée au niveau des oligodendrocytes, des membranes des cônes de croissance et des membranes post-synaptiques. Elle contribue entre autre au contrôle du fonctionnement des synapses glutaminergiques et GABAergiques ainsi qu'à l'induction de la potentialisation à long terme dans l'hippocampe et le bulbe olfactif.

✦ Cette nouvelle famille de protéines contient communément un **motif d'adhésion cellulaire** composé de six **motifs cadhérines**. Leur **domaine extracellulaire** est fort **comparable** aux autres cadhérines, mais leur **domaine cytoplasmique**, bien que conservé au sein de cette famille, est **différent** des cadhérines classiques: toutes possèdent quatre domaines **PxxP** susceptible d'interagir avec des protéines contenant un domaine **SH3** tel que **Fyn**. En plus des sites d'interactions **homophyles** propres aux cadhérines, elles contiennent des sites potentiels d'interaction **hétérophyles** que l'on ne retrouve pas sur les cadhérines classiques. Elles possèdent aussi des répétitions de cystéines transmembranaires ou intracytoplasmiques. (N. Kohmura et al.1998)

✦ Leur **pattern d'expression** est comparable à celui des autres cadherines, mais se limite au **SNC**. Dans un cerveau adulte, la **distribution** des mRNA des CNRs est similaire à ceux de **Fyn**. On les retrouve dans le **néocortex**, l'**hippocampe**, le **cervelet** et le **bulbe olfactif**. Cependant, chaque neurone exprime un **set spécifique** de CNRs. Ce sont des **marqueurs fonctionnels** des neurones et des synapses. Elles interviennent aussi dans la **plasticité synaptique**, qui est un déterminant majeur de l'apprentissage. Leurs répétitions de cystéines leur donnent la possibilité de s'assembler via des liens ioniques impliquant des cations, pour former des **dimères**, voir des **trimères spécifiques**. Le nombre de CNRs étant de 20, ceci offre la possibilité de former de 400 à 8000 complexes différents.

✦ Récemment, il a été démontré que les CNRs étaient capables d'interagir avec la **Reelin** grâce à un domaine **RBD** (Reelin binding domain) conservé parmi toutes les CNRs. La **Reelin** s'y lie via son domaine **N-terminal**, et cette liaison est bloquée par l'anticorps CR-50 qui est justement dirigé contre ce domaine, de même que par un anticorps dirigé contre le motif RBD des CNRs. Il en résulte une **diminution** de la **phosphorylation de Dab-1** dépendant de la **Reelin**, et cette diminution peut aussi être provoquée par l'inhibition de la tyrosine kinase de la famille Src. Cependant, cette liaison ne semble pas bloquée par l'anticorps G-10 dont l'épitope recouvre une petite partie de celui reconnu par CR-50 car l'incubation de neurones en développement en présence de cet anticorps ne bloque pas la fonction de la Reelin.

✦ Sur base de ces nouvelles données, on peut émettre une nouvelle **hypothèse** sur les mécanismes de transduction du signal Reelin. Les CNRs liant Fyn seraient les **récepteurs** de la **Reelin** tandis que **VLDLR** et **ApoER2**, qui lient **Dab-1** seraient des **co-récepteurs**. La liaison de la **Reelin** entraînerait la **phosphorylation** de **Dab-1** par **Fyn**, et le signal serait transmis alors via une **cascade de kinases** jusqu'au complexe **Cdk5-p35** intervenant dans la **réorganisation des microtubules**. Via les CNRs, la **Reelin** induirait la **différentiation** des neurones, leur **positionnement**, leur **détachement** des fibres gliales, et la **synaptogénèse** (K. Senzaki et al.1999).

Figure 6'

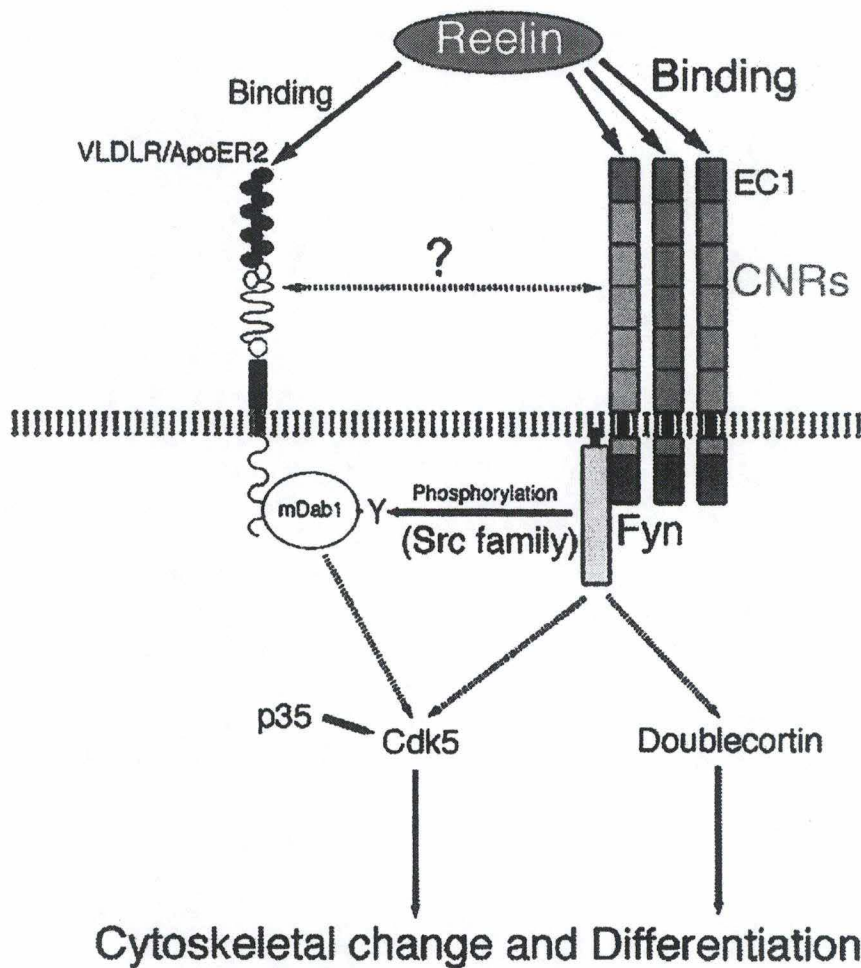


Figure 6' : Voie de signalisation hypothétique de la Reelin. La Reelin interagit directement avec les CNRs sur la surface neuronale. Dans la mesure où ces CNR interagissent communément avec la « tyrosine kinase » Fyn, le signal Reelin active Fyn et Fyn phosphoryle Dab-1 ou d'autres protéines cytoplasmiques. Dab-1, associé aux récepteurs VLDLR et ApoER2 est phosphorylé et active les composants en aval.

✦ Pour démontrer cette interaction entre la **Reelin** et les **CNRs**, des cellules **COS** ont été transfectées avec le gène de la **Reelin**, et la protéine a été isolée à partir de l'**homogénat** de ces cellules. Or, il semble que lorsque la Reelin est isolée de cette manière, ses interactions avec d'autres protéines **manquent de spécificités**. Dans la mesure où cette expérience a été retentée plusieurs fois avec d'autres sources de Reelin sans succès, la valeur de ces résultats est à remettre en question.

4. Liens avec la maladie d'Alzheimer.

4.1 La liaison de la Reelin à VLDLR et ApoER2 module la phosphorylation de la protéine Tau.

➤ **Tau** est une protéine ayant une fonction **stabilisante** sur les **microtubules**. Sous sa forme **hypophosphorylée**, Tau lie et **stabilise** les microtubules, alors que son **hyperphosphorylation** induit son **détachement** du cytosquelette. Il semble que la formation d'**enchevêtrement** (tangle) dans les neurones des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer est due à cette hyperphosphorylation. Ces enchevêtrements seraient causés par la formation de **filaments hélicoïdaux** **paillés** de la protéine. Ces filaments s'accumulent dans le **corps cellulaire** et dans les **dendrites**. De plus, **Tau** a la capacité de moduler la distribution de **MAP-2** (microtubules associated protein). Lorsque ces deux protéines sont dérégulées, les microtubules se désagrègent rapidement.

➤ Chez les souris de phénotype **Reeler**, que cela soit dû à l'absence de Reelin ou à la double mutation des récepteurs VLDLR et ApoER2, **Tau** est **hyperphosphorylé**. Il est intéressant de constater que cette hyperphosphorylation était réduite de moitié chez les souris n'ayant qu'un seul de ces récepteurs VLDLR ou ApoER2 (T. Hiesberger et al. 1999).

4.2 Dab-1, comme FE-65 peuvent se lier à l'APP et aux récepteurs LDL.

◆ **Dab-1** et **FE-65** sont toutes deux des protéines **adaptatrices**. Elles sont capables d'interagir avec le domaine **NPxY** d'autres protéines tels que des **précurseurs amyloïdes** ainsi que certains **récepteurs LDL**.

◆ **L'APP** est une protéine codée par le **chromosome 21** et qui, suite à son clivage, produit un peptide de **40** ou **42** résidus appelés peptide bêta amyloïde. La production d'un peptide de **42** résidus est **rare** et dépend en partie du fond génétique de l'individu. Ces peptides de **42** résidus donnent naissance aux **plaques amyloïdes** caractéristiques de la maladie d'Alzheimer

- La **spécificité** de la liaison entre les deux protéines **adaptatrices** et l'**APP** dépend de la séquence entourant le motif **NPxY**. **Dab-1** et **FE-65** sont capable d'interagir avec le motif **NPxY** du récepteur **LRP**, via leur domaine **PTB** situé à leur extrémité N-terminal. De même, ces protéines peuvent interagir avec le domaine cytoplasmique des **APP**, **Dab-1** toujours via son domaine **PTB** et **FE-65** avec son domaine **C-terminal**.

- On peut déjà entrevoir ici que **FE-65** pourrait **rapprocher** les domaines cytosoliques de **LRP** et **APP** en tenant l'un via son domaine N-terminal et l'autre via son domaine C-terminal. Cette hypothèse est renforcée par la capacité qu'ont les domaines **Kunitz**, compris dans certaines séquences extracellulaires d'**APP**, à interagir avec le domaine extracellulaire de **LRP**. Il y a donc une possibilité de **double pontage** entre **APP** et **LRP**, l'un intracellulaire via la protéine **FE-65**, et l'autre **extracellulaire**.

- **Dab-1**, qui a la capacité de lier **LRP**, peut interagir avec des **tyrosine kinases**. Il existe donc un **lien direct** entre la maladie d'**Alzheimer** et la voie de signalisation **Reelin** (M. Trommsdorff et al. 1998).

4.3 Les récepteurs VLDLR et ApoER2 sont capable de lier ApoE qui est présent dans le cerveau.

- ◆ **ApoE** est une protéine **carrier** de lipoprotéine de faible densité (LDL). Il existe trois isoformes majeurs, **ApoE2**, **E3** et **E4**, qui sont encodées par les trois **allèles** du gène humain **epsilon 2**, **3** et **4**. Cette protéine carrier, qui est capable de lier tous les membres de la famille des **récepteurs LDL**, **inhibe** la liaison de la **Reelin** à **ApoER2** et à **VLDLR**.

- ◆ Lorsque **ApoE** est incorporé dans les particules **LDL**, il est **multivalent** et son **affinité** pour ses récepteurs **augmente**. Il est donc possible qu'il soit capable d'induire la **dimerization** des récepteurs et donc **altérer** le degré de **phosphorylation** de molécules de signalisation cellulaire (M. Trommsdorff et al. 1999).

- ◆ Il a été démontré que **ApoE3** et **E4**, qui sont les allèles les plus **fréquents** chez l'homme, **inhibaient** fortement la liaison de la **Reelin** aux **LDLR** et **diminuaient** d'environ 50% le niveau de **phosphorylation** de **Dab-1**, phosphorylation en partie induite par la **Reelin**. Cet effet est aussi observé, mais dans une moindre mesure, pour l'isoforme **ApoE2**.

Figure 7'

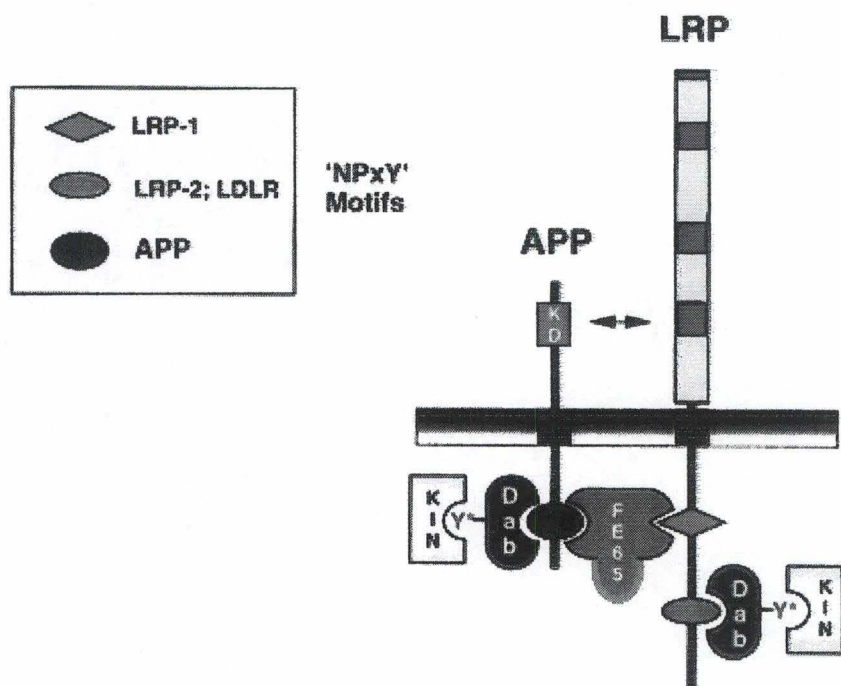


Figure 7' : Modèle hypothétique pour l'assemblage des complexes multiprotéiques sur le domaine cytoplasmique des récepteurs de la famille LDL. Dab-1 peut directement lier le domaine cytoplasmique du récepteurs LRP et de APP. Sous sa forme phosphorylée, Dab-1 peut interagir avec des protéines kinases à domaine SH2. FE-65 peut lier en même temps l'APP et LRP et réaliser un pontage de leur domaine cytoplasmique, et le domaine de Kunitz compris dans la partie extra-cellulaire de l'APP peut lier le domaine extra-cellulaire de LRP.

◆ Même en absence de Reelin, ApoE3 est capable de diminuer le niveau de phosphorylation de Dab-1 d'environ 10%. **L'inhibition** de la liaison de la **Reelin** à ses **récepteurs** est de type **compétitive**. Tout ceci peut être expliqué par l'affinité de liaison des différentes isoformes de ApoE. En effet, **ApoE3** et **E4** ont une **affinité** pour VLDLR et ApoER2 **supérieure** à ApoE2. La compétition entre les isoformes 3 et 4 et la Reelin pour ces récepteurs sera donc en défaveur de cette dernière, et subséquemment la diminution de la phosphorylation de Dab-1 dû à l'absence de Reelin s'en fera d'autant plus ressentir (G. D'Arcangelo et al. 1998).

◆ **ApoE3** et **E4** lient les récepteurs avec une affinité équivalente, mais préfèrent des **particules LDL** de différentes tailles. Ces différences dans les propriétés physico-chimiques des isoformes d'ApoE pourraient expliquer pourquoi ApoE3 et ApoE4 affectent de manière différente la croissance des neurites et leurs branchements (M. Trommsdorff et al. 1999).

◆ Chez les personnes portant l'allèle **epsilon 4** et qui sont atteintes de la maladie, on observe un excès de plaques amyloïdes. De plus, chez ces personnes qui représentent environ **40 %** des malades, la maladie apparaît généralement plus tôt que chez les autres. Une hypothèse suggère que le **peptide bêta amyloïde** et l'**apolipoprotéine E** soient **transportés** à l'intérieur de la cellule par une **même protéine**, mais que son affinité de l'apolipoprotéine E est supérieure à celle qu'elle a pour le peptide bêta amyloïde. Dès lors, cette protéine transporterait préférentiellement l'apolipoprotéine E au détriment du peptide bêta amyloïde qui s'accumulerait alors dans les espaces intercellulaires. L'apolipoprotéine E agirait par **inhibition compétitive**, donc de la même manière que lorsqu'il inhibe l'action de la Reelin.

II. Résultats.

✖ Chez la souris, les **mutations séparées ou conjuguées des gènes VLDLR et ApoER2** affectent principalement trois structures cérébrales : le cortex, l'**hippocampe** et le **cervelet**. Je décrirai dans ce chapitre les caractéristiques de l'hippocampe et du cervelet chez les différents mutants.

Figure 1

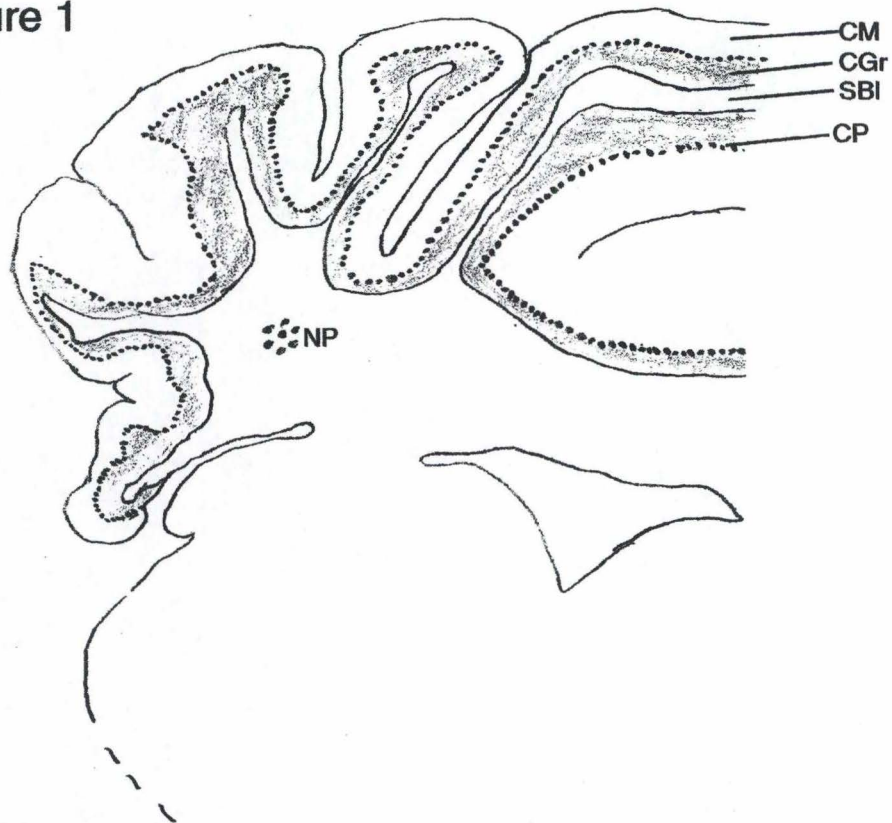


Figure 1 : schémas d'une moitié de cervelet normal en coupe coronale.

CM : couche moléculaire ; CGr : couche granulaire ; SBI : substance blanche ; CP : couche de Purkinje ; NP : noyaux profonds.

1. Etude du cervelet.

➤ Le **cervelet normal** est constitué d'une **substance grise** à l'extérieur appelée **cortex cérébelleux**, et d'une **substance blanche** interne, principalement constituée de fibres afférentes et efférentes venant de, et allant vers le cortex. Elle constitue le centre des nombreux folia autour desquels le cortex se dépose, et contient les **noyaux cérébelleux**.

➤ Le **cortex** est composé de trois couches : la couche **moléculaire** la plus externe, la couche **granulaire**, et la couche de **Purkinje** séparant les deux. La couche de Purkinje est composée d'une seule couche de cellules dont les ramifications se prolongent dans la couche moléculaire, qui contient très peu de cellules. Un schéma d'une moitié de cervelet normal est présenté à la figure 1.

➤ Avec la coloration de **Nissl**, la couche **moléculaire** apparaît fort claire, et les **grains** de la couche **granulaire** sont de couleur bleu foncé. Les cellules de **Purkinje** sont colorées en violet ; leur noyau est un peu plus clair que leur cytoplasme. La **substance blanche** ressemble à la couche **moléculaire**, mais s'en distingue par un aspect fibreux et légèrement plus clair.

➤ Les cellules composant les **noyaux cérébelleux** ressemblent aux cellules de **Purkinje**. Une caractéristique histologique propre aux cellules de **Purkinje** est l'épaississement d'une partie de la membrane nucléaire qui apparaît comme une ligne plus sombre, mais l'incidence de coupes ne permet pas toujours de le voir. Bien que, dans un cervelet normal, la **localisation** respective de ces deux types de cellules soit **exclusive**, ce n'est pas toujours le cas chez les souris mutantes.

➤ Une méthode pour mettre en évidence les **cellules de Purkinje** est le marquage immunohistochimique de la **Calbindin** qui est une protéine cytoplasmique propre à ces cellules. Elles apparaissent alors clairement avec des ramifications dendritiques se prolongeant dans la couche **moléculaire**.

→ Les mutations des gènes étudiés affectent profondément les structures cérébelleuses et principalement la **foliation**, rendant difficile l'identification de chaque **lobe**. Dès lors, la **nomenclature** adoptée est arbitraire et spécifique à chaque micrographie.

Figure 2

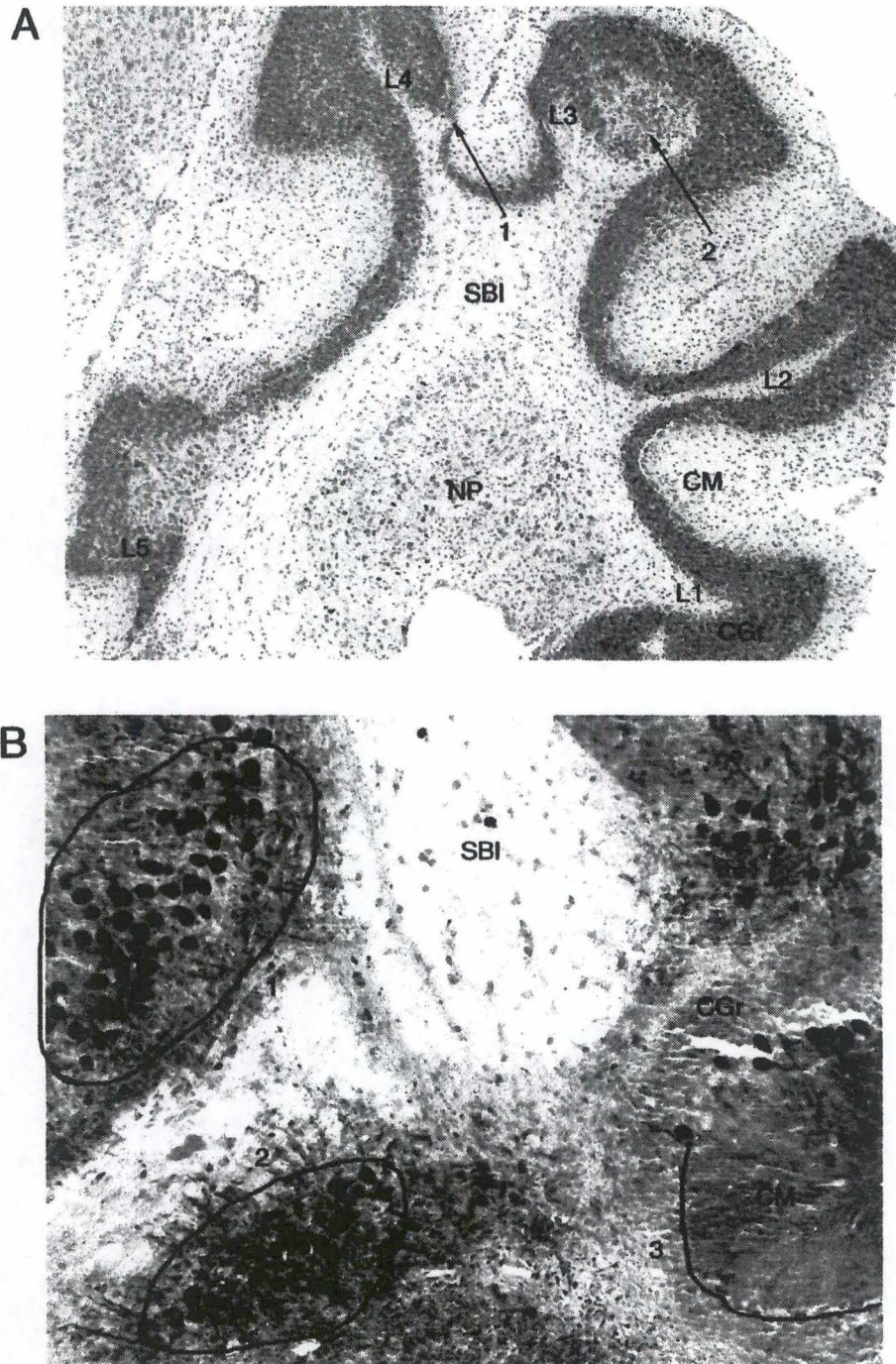


Figure 2 : coupe sagittale de cervelet de souris mutante VLDLR ^{-/-}.

A : coloration de Nissl. Les lobes sont numérotés de L1 à L5. Les flèches indiquent les anomalies de la couche granulaire.

1 : affinement excessif ; 2 : les grains envahissent la substance blanche.

B : marquage immunohistochimique de la calbindin. Les deux cercles entourent des cellules de Purkinje ectopiques. 1 : les cellules ont envahis la couche granulaire ; 2 : les cellules de Purkinje s'amassent au niveau des noyaux profonds. La ligne 3 indiquent où ces cellules devraient être. SBI : substance blanche ; CGr : couche granulaire ; CM : couche moléculaire ; NP : noyau profond.

Figure 3

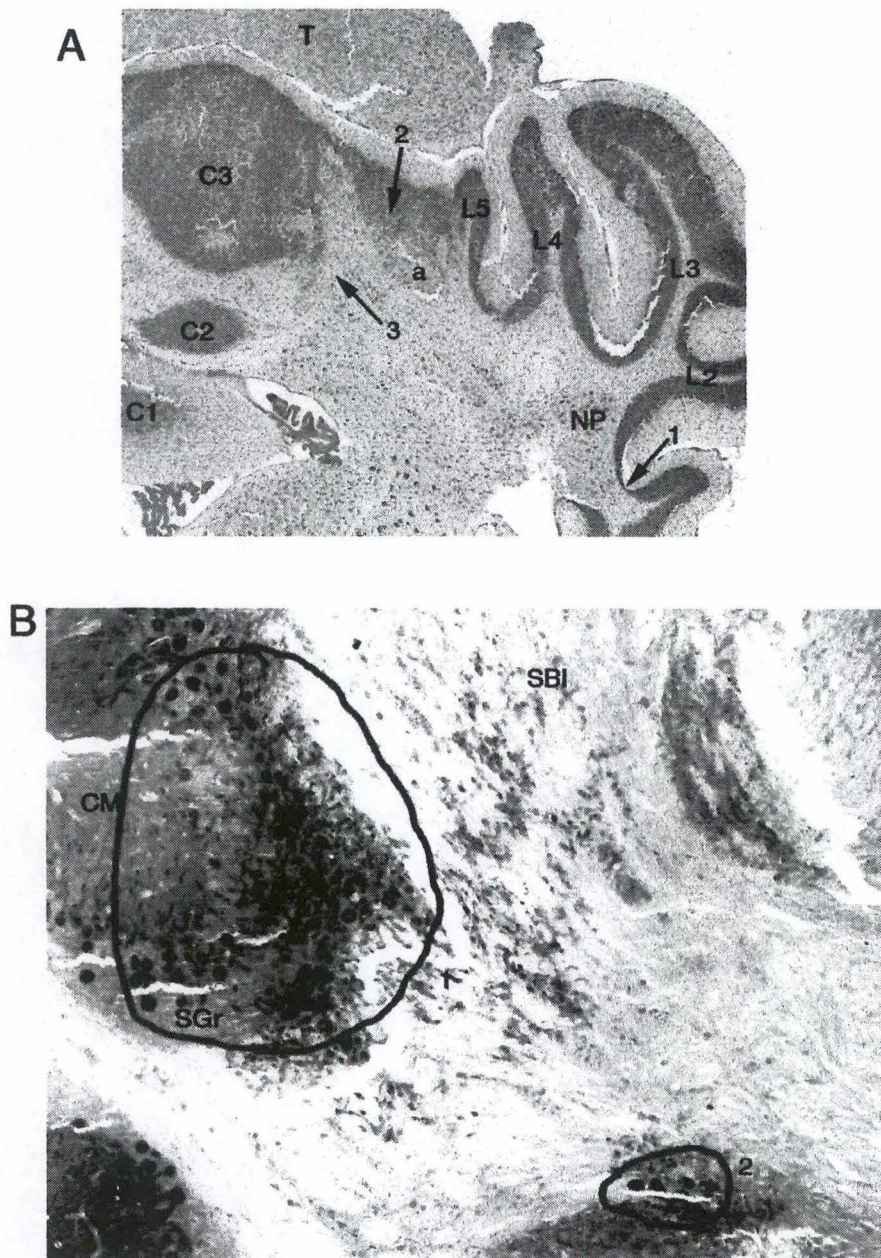


Figure 3 : coupe coronale de cervelet de souris VLDLR -/-

A : coloration de Nissl. Les lobes latéraux sont numérotés de L1 à L5 de la partie inférieure vers la partie supérieure. Les lobes vermiens sont numérotés de C1 à C3. flèche 1 : affinement excessif de la couche granulaire; flèche 2 : les grains envahissent la substance blanche ; flèche 3 : les cellules de Purkinje forment de part et d'autre de la flèche des traînées orientées dans le sens des fibres ; a : amas de cellules de Purkinje.

B : marquage immunohistochimique de la calbindin. Les cercles entourent les cellules de Purkinje ectopiques. 1 : les cellules ont envahi la couche granulaire ; 2 : les cellules s'accumulent dans la substance blanche.

SBI : substance blanche ; CGr : couche granulaire ; CM : couche moléculaire ; NP : noyau profond ; T : tectum.

1.1 Le cervelet chez les souris mutantes pour VLDLR.

• Dans une coupe **sagittale** (figure 2), le cervelet apparaît **atrophie** et la **foliation** **déficiente**. Le nombre de lobe est de 6 à la place de 8 (le sixième n'est pas visible sur la micrographie présentée). Les **anomalies** touchent principalement les **lobes supérieurs et internes**.

▸ Les lobes **L1** et **L2** sont les moins touchés par la mutation. La couche **granulaire** est homogène et d'épaisseur normale. La mutation n'affecte que la répartition des cellules de **Purkinje**, qui sont mal alignées et qui ont tendance à envahir la couche **granulaire**.

▸ Le lobe **L3** contient dans la **substance blanche** centrale un amas de **grains** de densité variable (figure 2A : flèche 2). Les zones les plus fibreuses de cet amas contiennent quelques cellules de **Purkinje**.

▸ A la base du lobe **L4**, la couche **granulaire** s'affine excessivement (figure 2A : flèche 1).

▸ Le lobe **L5** contient en son centre un amas de cellules de **Purkinje** qui envahit la **substance blanche**.

• En coupe **coronale** (figure 3), on observe que l'**atrophie** touche principalement la partie **vermienne** du cervelet et épargne les parties latérales où la **foliation** paraît relativement normale. D'une manière générale, peu de cellules de **Purkinje** ont correctement migré pour s'aligner en une monocouche délimitant la couche **moléculaire** de la couche **granulaire**.

▸ Celles qui y sont parvenues se trouvent aux extrémités des **lobes** latéraux **L1** et **L2**. Ces lobes paraissent **normaux** si ce n'est une couche **granulaire** qui s'affine excessivement au niveau du repli interne les reliant (figure 3A : flèche 1). Ces zones contiennent peu de cellules de **Purkinje**.

▸ Le lobe **L3** est plus anormal : les cellules de **Purkinje** envahissent la couche **granulaire** peu dense. Ceci est très visible au niveau du repli externe. Dans le lobe **L4**, la majorité des cellules de **Purkinje** ont envahi la couche **granulaire**.

▸ Les lobes **vermiens** sont les plus **anormaux** : la couche **granulaire** est extrêmement **lâche** et contient un grand nombre de cellules de **Purkinje** ectopiques qui ont tendance à se regrouper en **amas**. Dans ces amas, la densité de la couche **granulaire** est faible. Dans le lobe **C3**, la couche **moléculaire** externe est plus fine que normalement.

► Les lobes **C3 et L5** sont reliés par une couche **granulaire** anormale dont la densité diminue en gradient : la densité est maximale à l'extérieur et diminue vers l'intérieur (figure 3A : flèche 2). Ceci donne l'impression que la couche **granulaire** se répand dans la **substance blanche**. A la base de ce gradient dans la **substance blanche** se trouve un amas de cellules de **Purkinje** (figure 3A : a).

► Dans la **substance blanche**, on trouve aussi quelques cellules de **Purkinje**(figure 3A : flèche 3). Elles forment des **traînées** orientées dans les sens des fibres, ou alors s'amassent dans des zones plus profondes à proximité des **noyaux cérébelleux**.

Figure 4

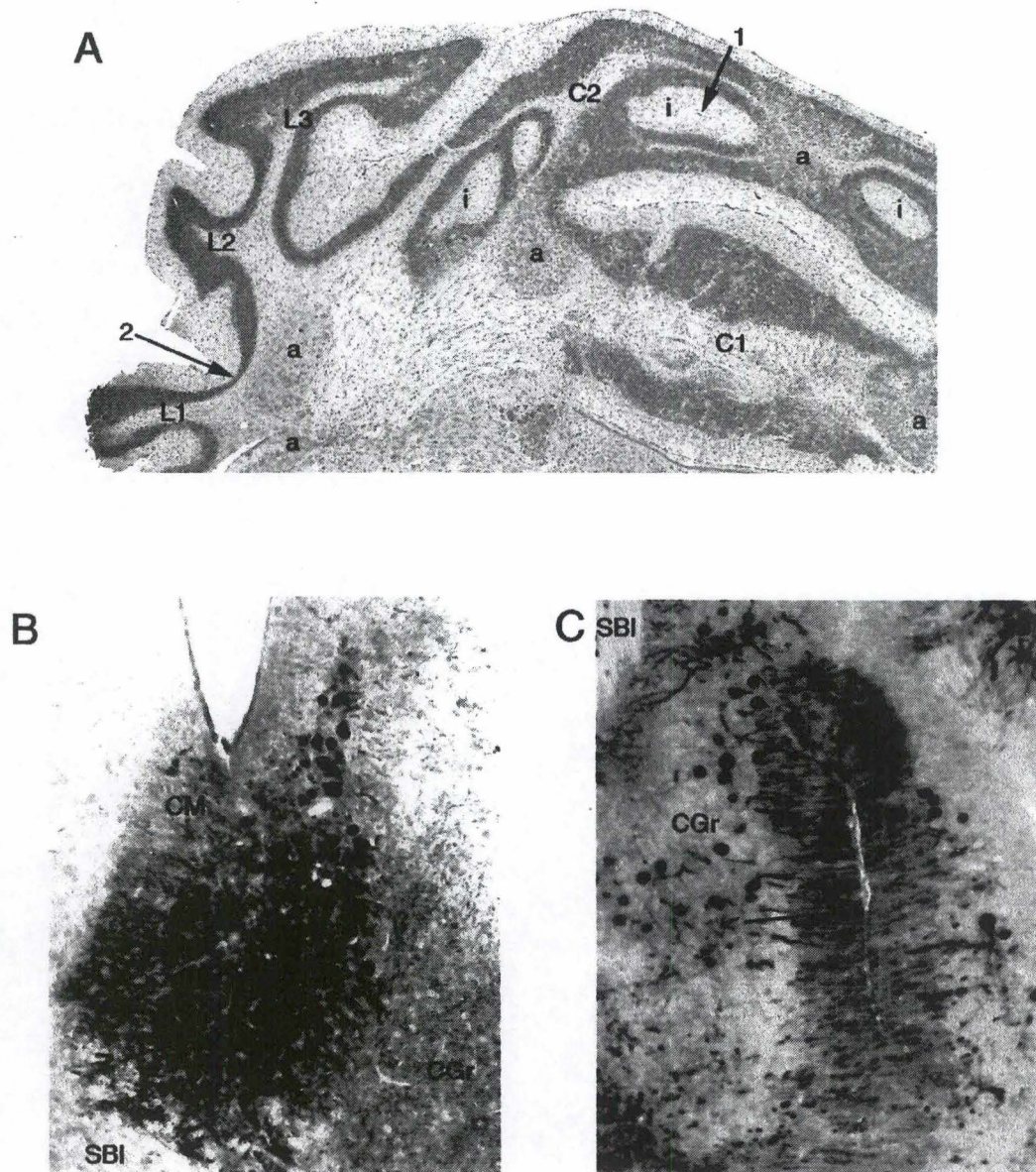


Figure 4 : coupe coronale de cervelet de souris VLDLR $-/-$ ApoER2 $+/-$

A : coloration de Nissl. Les lobes latéraux sont numérotés de L1 à L3. Les lobes vermiens sont numérotés de C1 à C3. i : invagination d'un lobe, La flèche 1 indique la division de la couche moléculaire ; la flèche 2 pointe un affinement excessif de la couche granulaire. a : amas de cellules de Purkinje ectopiques.

B et C : marquage immunohistochimique de la calbindin.

B : amas de cellules de Purkinje à la base du lobe L1. C . invagination d'un lobe. La flèche pointe la division de la couche moléculaire.

SBI : substance blanche ; CGr : couche granulaire ; CM : couche moléculaire ;

1.2 Cervelet de souris de phénotype VLDLR -/- ApoER2 +/-.

■ Les **caractères** observés pour le phénotype précédent sont **accentués**, et de **nouveaux** caractères apparaissent. L'atrophie du cervelet est plus importante et se remarque déjà à l'œil nu. Comme précédemment, les **lobes latéraux** sont toujours relativement bien **conservés** mais paraissent cependant un peu moins développés (figure 4).

✕ Dans les lobes **L1** et **L2**, la plupart des cellules de **Purkinje** sont correctement placées. Celles qui ne le sont pas se répartissent de manière aléatoire dans la couche **granulaire**. Ces lobes sont reliés par une couche granulaire trop fine (figure 4A : flèche 2).

✕ Dans les lobes vermiens, les anomalies sont plus fortes. Les lobes **C1** et **C2** sont composés d'une couche **granulaire** de **densité variable**. Les zones les moins denses contiennent quelques cellules de **Purkinje**. Dans le lobe **C1**, la **substance blanche** contient quelques **grains** et cellules de **Purkinje**.

■ Les cellules de **Purkinje** forment en tout **sept amas** dans la substance blanche (figure 4A : a). Cinq sont visibles sur la figure 4A. Le premier se trouve à la base du lobe **L1**. Le second amas se trouve plus bas, à la base du repli reliant le lobe **L1** et **L2** (figure 4B). Deux autres amas, plus importants, sont ancrés latéralement dans la couche **granulaire** du lobe **C1** et se prolongent dans la **substance blanche** vers les zones profondes. Le dernier amas, un peu plus petit et moins dense, se trouve dans la partie centrale du lobe **C2**. A ce niveau, la **substance blanche** est complètement envahie par des **grains**.

■ A certains endroits dans la **substance blanche**, on observe la formation de **structures ovales** et concentriques délimitées par de la couche **granulaire** (figure 4A : i). Le centre de ces structures est composé d'une couche **moléculaire**. Elle est divisée en deux comme s'il s'agissait de la couche **moléculaire** de deux lobes adjacents (figure 4C). Ces deux couches sont séparées par quelques cellules de **Purkinje** qui ont tenté de s'aligner. Par rapport à un lobe normal, l'ordre des couches est donc inversé. Ces structures résultent de l'**invagination** du lobe **C2**.

■ Dans un cervelet VLDLR -/- ApoER2 +/-, **cinq structures** de ce type sont observées. **Trois**, dont une dédoublée, sont visibles sur la figure 3 dans les lobes **C2**. La quatrième **invagination** se situe à l'extrémité latérale du lobe **C2** et n'est pas visible sur la figure 4. La cinquième se trouve à un niveau plus profond du cervelet, dans un lobe **vermien**.

Figure 5

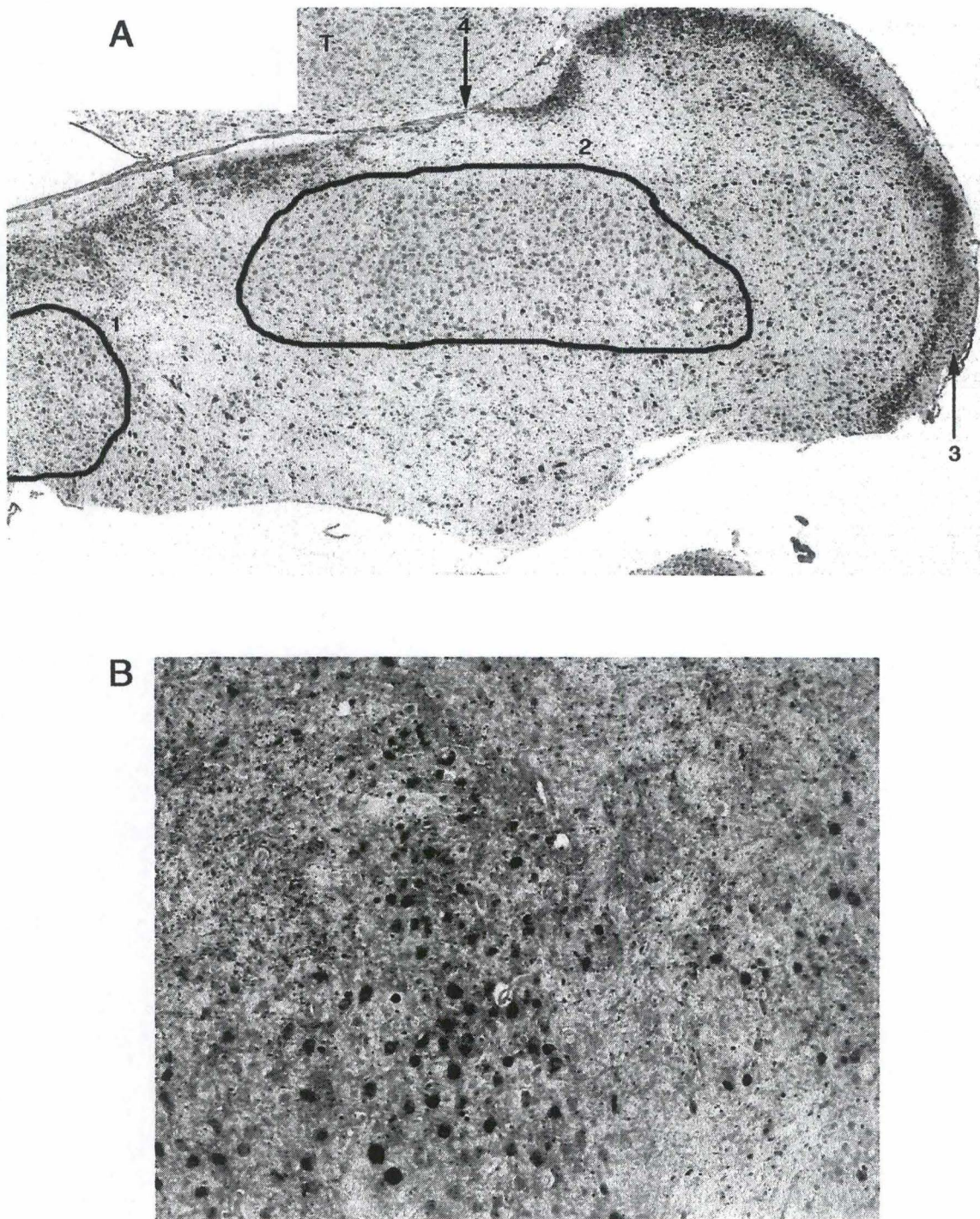


Figure 5 : coupe frontale de cervelet VLDLR $-/-$ ApoER2 $-/-$.

A : coloration de Nissl. 1 et 2 : « central Purkinje cells mass » centrale et latérale ; 3 : les cellules à grains envahissent la couche moléculaire ; 4 : absence de couche moléculaire et granulaire ; T : tectum.

B : marquage de la calbindin. Les cellules de Purkinje se répartissent aléatoirement dans les « central Purkinje cells mass »

1.3 Cervelet de souris de phénotype VLDLR -/- ApoER2 -/-.

● Chez ces souris (figure 5), le phénotype observé dans le cervelet est **comparable** au phénotype **reeler**, dont les caractéristiques majeures sont une **atrophie sévère** bien visible à l'œil nu, et l'**absence de foliation**.

● Bien que quelques grains envahissent la **substance blanche**, la majorité sont correctement placée. Cependant, leur **nombre** est fortement **réduit**.

● Au **centre** du cervelet se trouve la **substance blanche** envahie par les cellules à **grains** et les cellules de **Purkinje**. Les **grains** se répartissent aléatoirement tandis que les cellules de **Purkinje** forment trois larges **amas** peu denses (figure 5A : 1 et 2).

➤ Le **premier** se situe au centre de la partie inférieure. Il est divisé en deux par une bande fibreuse centrale partant de la partie inférieure vers la partie supérieure du cervelet.

➤ Les **deux autres** se trouvent un peu plus haut de chaque côté de cet amas central.

● Ces amas sont séparés par des zones fibreuses. Ce type d'amas a été décrit chez les souris **reeler** sous le nom de "**central Purkinje cell mass** "

Figure 6

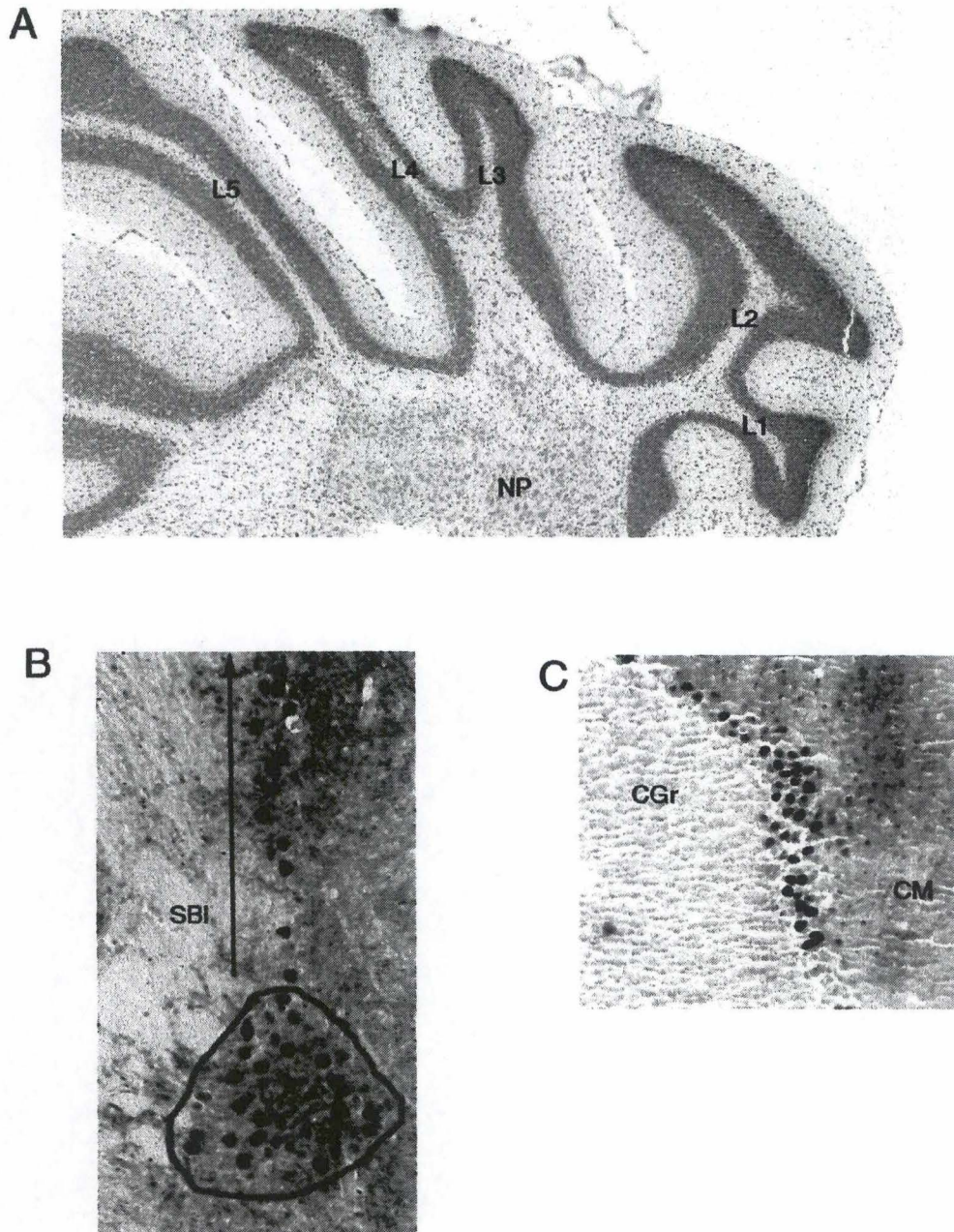


Figure 6 : coupe frontale de cervelet de souris ApoER2 -/-

A : coloration de Nissl. Les lobes latéraux sont numéroté de L1 à L5. A l'exception de cellules de Purkinje amassées dans les noyaux profonds, ce cervelet est normal.

B et C : marquage immunohistochimique de la calbindin.

B : le cercle entoure des cellules de Purkinje amassées dans les noyaux profonds. A droite de la flèche se trouve une traînée de cellules de Purkinje. C : la couche de Purkinje à une épaisseur de 2-3 cellules.

NP : noyaux profonds ; SBl : substance blanche ; CGr :couche granulaire ; CM : couche moléculaire.

1.4 Cervelet de souris mutantes pour ApoER2.

✦ Dans l'ensemble, le cervelet paraît **normal** (figure 6A). La **foliation** est régulière et semble complète, et les **lobes** sont de taille normale. La couche **granulaire** a une densité et une épaisseur normales et est homogène.

✦ La seule **anomalie** concerne la disposition des cellules de **Purkinje** : la majorité de ces cellules ont correctement migré et se trouvent à leur place. Mais l'**alignement** n'est pas toujours régulier, et leur la couche atteint trois cellules à certains endroit (figure 6C). Cependant, ce caractère pourrait simplement être dû à l'**incidence de coupe**. Quelques cellules de **Purkinje** se trouvent dans la couche **granulaire**, mais cet événement est trop rare que pour être considéré comme pathologique.

✦ Une très **faible proportion** de ces cellules n'a pas réussi à migrer et reste amassée dans les **zones profondes** (figure 6B). D'autres se remarquent par une migration inachevée. Elles forment des **traînéees orientées** dans le sens des fibres

Figure 7

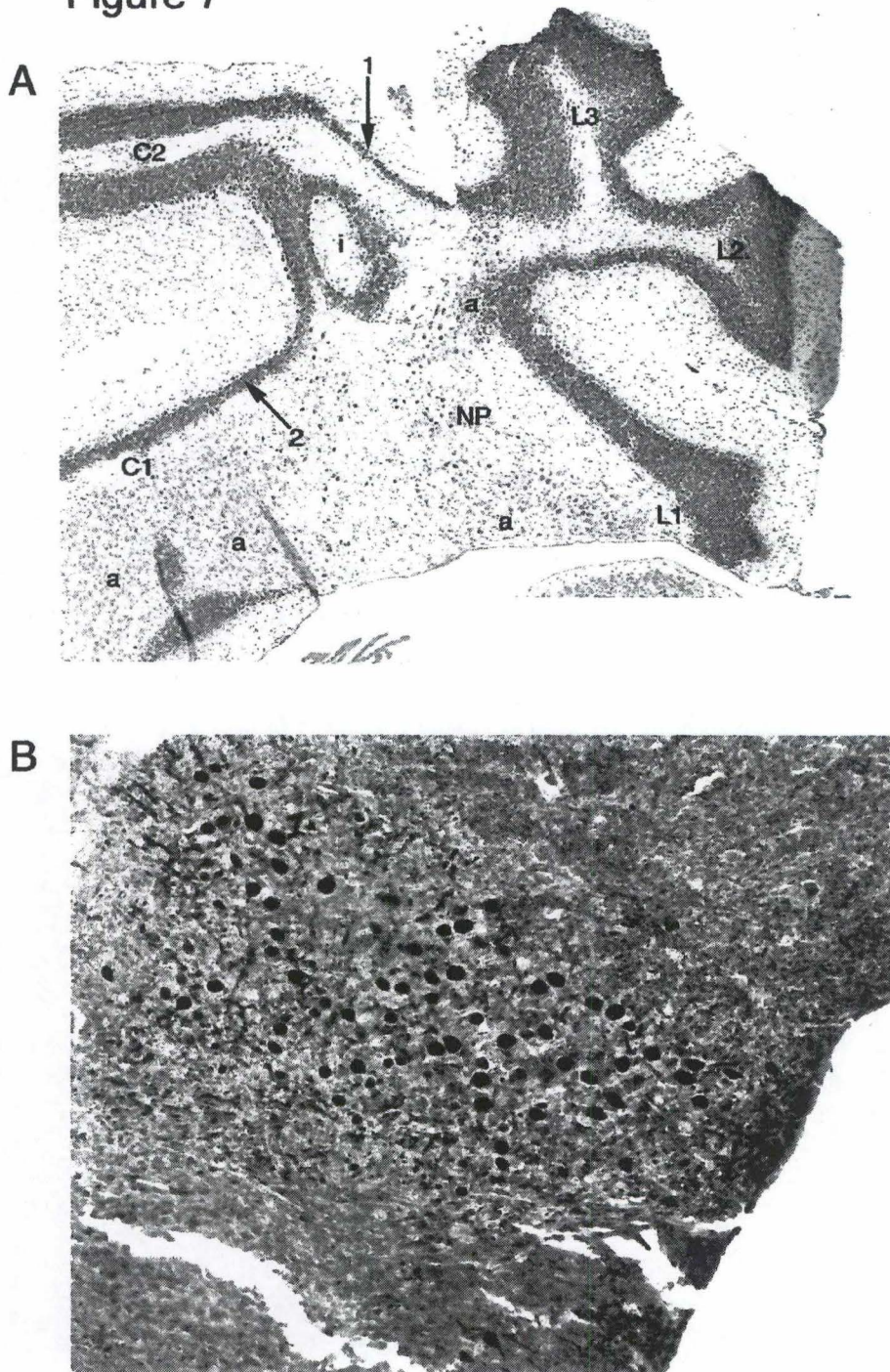


Figure 7 : coupe coronale de cervelet de souris ApoER2 $-/-$ VLDLR $+/-$.

A : coloration de Nissl. Les lobes latéraux sont numéroté de L1 à L3. Les lobes centraux sont numérotés de C1 à C2. a : amas de cellules de Purkinje ectopiques ; i : invagination d'un lobe voisin ; flèche 1 : affinement de la couche granulaire ; NP : noyau profond.

B : : marquage immunohistochimique de la calbindin. La micrographie montre un amas de cellules de Pukinje dans la substance blanche à la base du cervelet.

1.5 Cervelet de souris de phénotype ApoER2 -/- VLDLR +/-.

■ Bien que ce cervelet présente **quelques anomalies** (figure 7), il reste cependant **relativement normal**. La couche moléculaire est régulière et constante, de même que la majorité de la couche granulaire sous-jacente.

■ Le caractère le plus aberrant concerne les cellules de **Purkinje**, dont un grand nombre reste amassé dans les **zones profondes** (figure 7A : a ; figure 7B). La présence des cellules de Purkinje dans ces amas implique leur **absence** dans des zones où elles devraient être. Il s'agit des zones de jonction entre les **lobes latéraux** et **vermiens** qui sont caractérisées par une couche **granulaire** trop fine.

■ La **foliation**, bien que grossièrement normale, est **incomplète**. Elle présente quelques **aberrations** déjà décrites chez les souris VLDLR -/- ApoER2+/- . Il s'agit de la formation de structures ovales dans la **substance blanche**, dont le centre, formé par la couche **moléculaire** est entouré de couche **granulaire** qui diffuse dans la **substance blanche**. Ces deux couches sont séparées par des cellules de **Purkinje**. Ces structures résultent probablement de l'**invagination** du lobe. Elles sont au nombre de **deux** et sont ancrées latéralement dans le lobe **C2**.

Figure 8

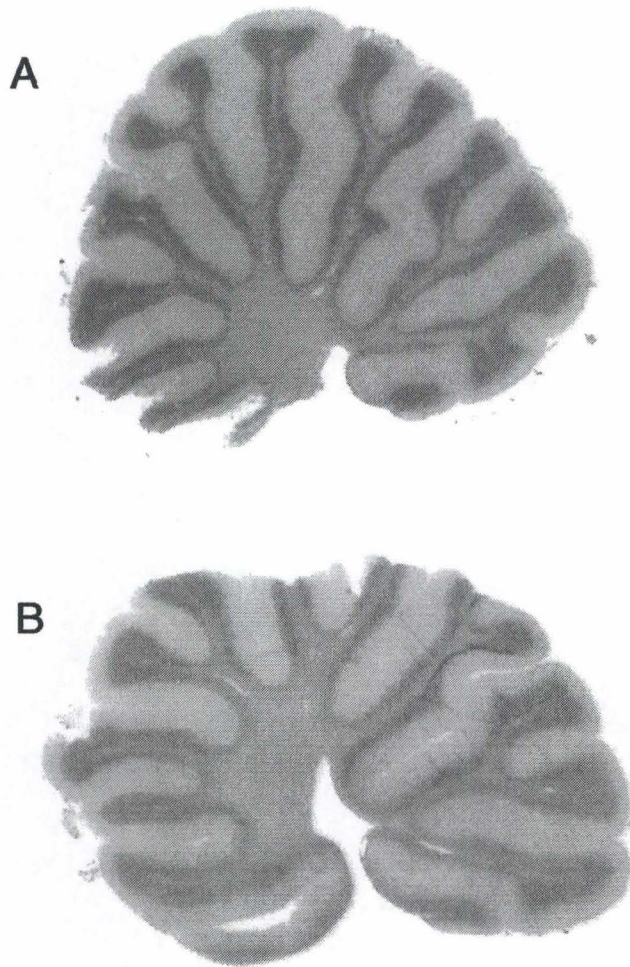


Figure 8 : coupe sagittale de cervelet de poulet colorées par la méthode de Nissl

A : cervelet de poulet normal

B : cervelet de poulet R/O (restricted ovulator =VLDLR -/-)

La mutation du gène VLDLR chez le poulet n'entraîne aucune des anomalies observées chez la souris.

1.6 Cervelet de poulet R/O (restricted ovulator).

▣ Chez le **poulet**, l'**inactivation** du gène **VLDLR** n'entraîne aucune des anomalies cérébelleuses qui touchent la souris (figure 8). La **taille** du cervelet est **normale**, de même que la **foliation** qui est aussi régulière que chez les poulets normaux. L'épaisseur des couches moléculaire et granulaire est constante, et ces deux couches sont séparées par une couche unique et régulière de cellules de Purkinje.

Figure 9

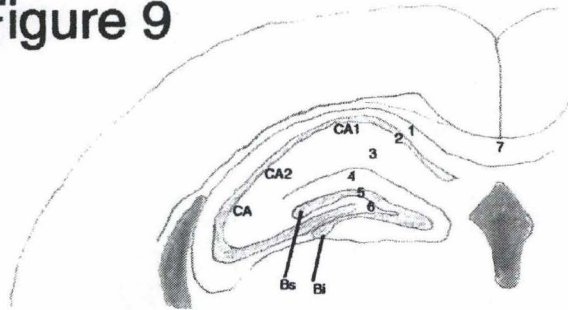


Figure 9 : schémas d'hippocampe normal en coupe coronale dans la partie rostrale.
 1 : substance blanche (alveus) ; 2 : couche pyramidale ; 3 et 4 : couche moléculaire ; 5 :
 couche granulaire ; 6 : couche polymorphe ; 7 : corps calleux.
 De 1 à 3 : hippocampe proprement dit ; De 4 à 6 : gyrus dentelé ; Bi : bras inférieur ; Bs : bras
 supérieur.

Figure 10

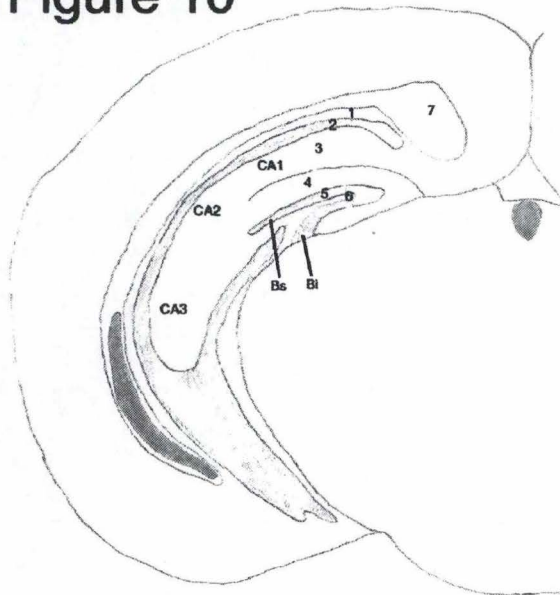


Figure 10 : schémas d'hippocampe normal en coupe coronale dans la partie caudale.
 1 : substance blanche (alveus) ; 2 : couche pyramidale ; 3 et 4 : couche moléculaire ; 5 :
 couche granulaire ; 6 : couche polymorphe ; 7 : corps calleux.
 De 1 à 3 : hippocampe proprement dit ; De 4 à 6 : gyrus dentelé ; Bi : bras inférieur ; Bs : bras
 supérieur.

2. Etude de l'hippocampe.

■ L'hippocampe est situé dans le télencéphale, sous le cortex. Il est composé des régions **CA1**, **CA2**, **CA3**, et du **gyrus dentelé**. Les trois régions se suivent, de la région **CA1** dans la partie **supérieure** à la région **CA3** dans la partie **inférieure**. Cette région descend jusque l'extrémité inférieure de l'hippocampe, puis forme une **courbure** avant de remonter vers le **gyrus dentelé** (figure 11 et 12).

■ Ces régions sont composées de **trois couches** superposées. De la couche supérieure à la couche inférieure, il s'agit de la **substance blanche** (1), la couche **pyramidale** (2), et la couche **moléculaire** (3). Avec la coloration de Nissl, seule la couche **pyramidale** est colorée. Elle est normalement formée de cellules **pyramidales** empilées sur une épaisseur de cinq à six cellules. Les autres couches sont presque acellulaires.

■ Le **gyrus dentelé** est composé de **trois couches** : une couche **moléculaire** externe, une couche **granulaire** ayant la structure d'une fourche à **deux bras**, un supérieur et un inférieur, délimitant une couche **polymorphe** interne. Seule la couche **granulaire** est colorée.

■ Les observations sont faites à deux niveaux de coupe **coronale**. Le premier est situé dans la partie **rostrale** de l'hippocampe, le deuxième dans la partie **caudale**.

▶ Dans la partie **rostrale**, l'hippocampe reste confiné dans la moitié supérieure du cerveau. Le début de la région **CA1** est très proche du **troisième ventricule dorsal**. Un schéma est présenté en figure 9.

▶ Dans la partie **caudale**, la région **CA3** descend jusque l'extrémité inférieure du cerveau où se trouve la **courbure**. Un schéma est présenté en figure 10

Figure 11

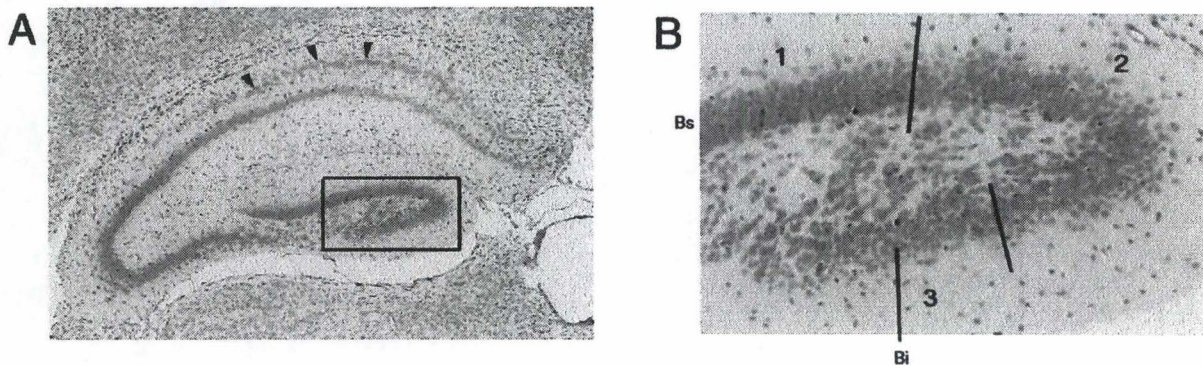


Figure 11 : coupe coronale d'hippocampe de souris ApoER2 $-/-$; partie rostrale.

A : la couche pyramidale des régions CA1 et CA2 sont dédoublées : têtes de flèche.

B : agrandissement du gyrus dentelé subdivisé en trois niveaux. Bs : bras supérieur ; Bi : bras inférieur ; 1, 2 et 3 se rapportent aux 3 niveaux d'organisation du gyrus.

Figure 12

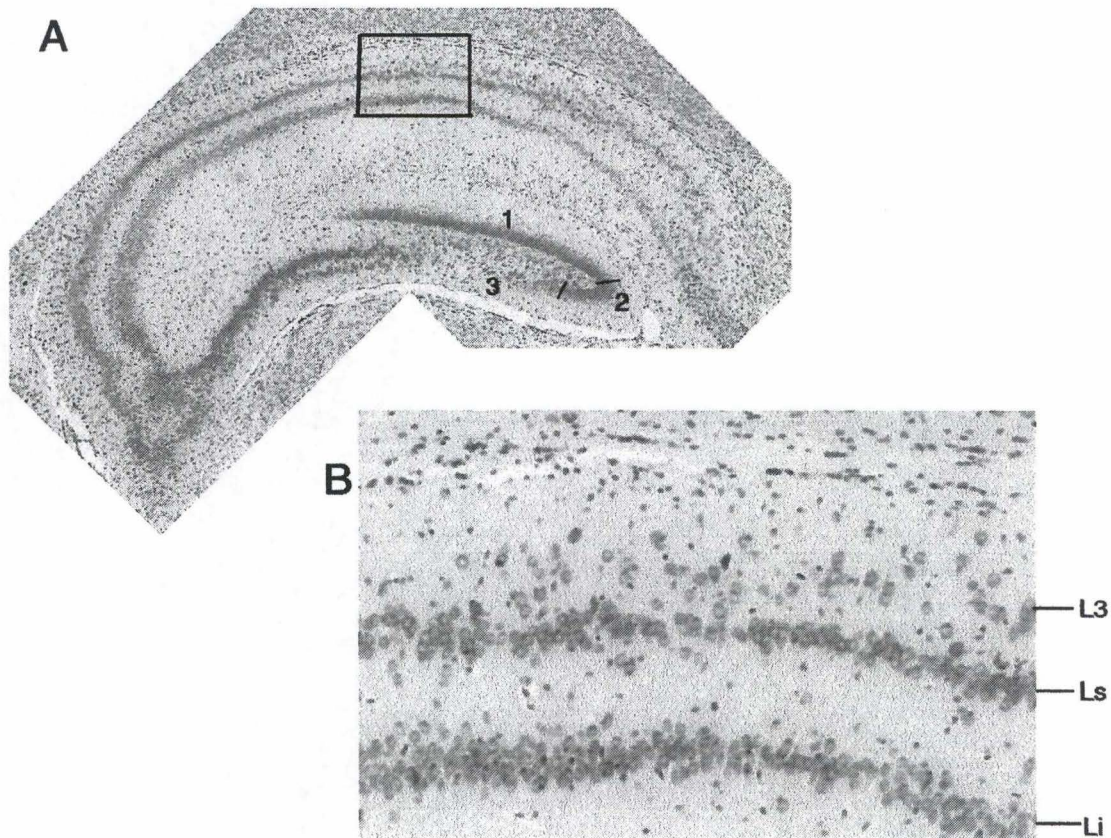


Figure 12 : coupe coronale d'hippocampe de souris ApoER2 $-/-$; partie caudale.

A : la couche pyramidale est dédoublée sur presque toute sa longueur. B :

agrandissement d'une partie de la région CA1. Li : ligne inférieure ; Ls : ligne supérieure ; L3 : 3^{ème} ligne (très floue).

2.1 L'hippocampe chez les souris mutantes pour ApoER2.

● Chez ces souris, la couche **pyramidale** est clairement **dédoublée** (figure 11). Dans la partie **rostrale** au début de la région **CA1**, les cellules forment **deux couches** irrégulières et lâches (figure 11A : têtes de flèche). La couche **inférieure** contient le plus de cellules et est la plus régulière. Vers la région **CA2**, l'épaisseur et la densité de la couche **supérieure** diminue, tandis que le phénomène inverse s'observe pour la couche inférieure. Au niveau de la région **CA3**, seul la couche **inférieure** subsiste. La **courbure** présente un aspect normal, de même que la couche remontant vers le **gyrus dentelé**.

● Le **gyrus dentelé** est profondément touché par la mutation. On y observe **trois niveaux d'organisation** (figure 11B).

▸ Le **premier niveau** d'organisation concerne la première partie du **bras supérieur**. La limite externe de ce bras est floue, tandis que sa limite interne reste plus ou moins nette. Les **grains** y forment un réseau légèrement trop lâche.

▸ Le **second niveau** comprend la seconde partie du bras supérieur jusqu'au début du **bras inférieur** en passant par la **courbure**. L'organisation des grains y est plus lâche, et ses limites externe et interne sont plus floues.

▸ Dans le **troisième niveau**, qui comprend le reste du **bras inférieur**, les **grains** ont une répartition encore plus lâche et envahissent la couche **polymorphe** centrale. Ce bras est réduite d'environ un tiers de sa longueur.

● Dans la partie **caudale**, la couche **supérieure** subsiste jusqu'à rejoindre la courbure, après laquelle elles fusionnent, puis se séparent de nouveau à proximité du **gyrus dentelé** (figure 12A). Elle est moins épaisse, moins cellulaire et moins régulière que la couche inférieure. Au début de la région **CA1**, les cellules **pyramidales** adoptent un pattern peu reconnaissable : la densité cellulaire de la couche **inférieure** est faible, et les cellules de la couche **supérieure** ont une distribution presque aléatoire. Dans le reste de cette région, les cellules pyramidales s'organisent de manière plus dense et plus régulière. Quelques cellules de répartissent sans organisation précise au-dessus de la couche **supérieure** et forment une **troisième couche** mal définie dans la substance blanche(figure 12B).

● Les **trois niveaux** d'organisation décrit précédemment dans le **gyrus dentelé** se retrouvent, avec de petite différence de localisation.

▮ Le **premier niveau** commence au début du bras supérieur et s'arrête au début de la courbure.

▮ Le reste de la courbure et le début du bras inférieur forme le **second niveau**.

▮ Le **troisième niveau** d'organisation comprend le reste du bras inférieur, dont la longueur est fortement réduite.

Ces niveaux sont caractérisés par les mêmes anomalies que celles décrites ci-dessus.

Figure 13

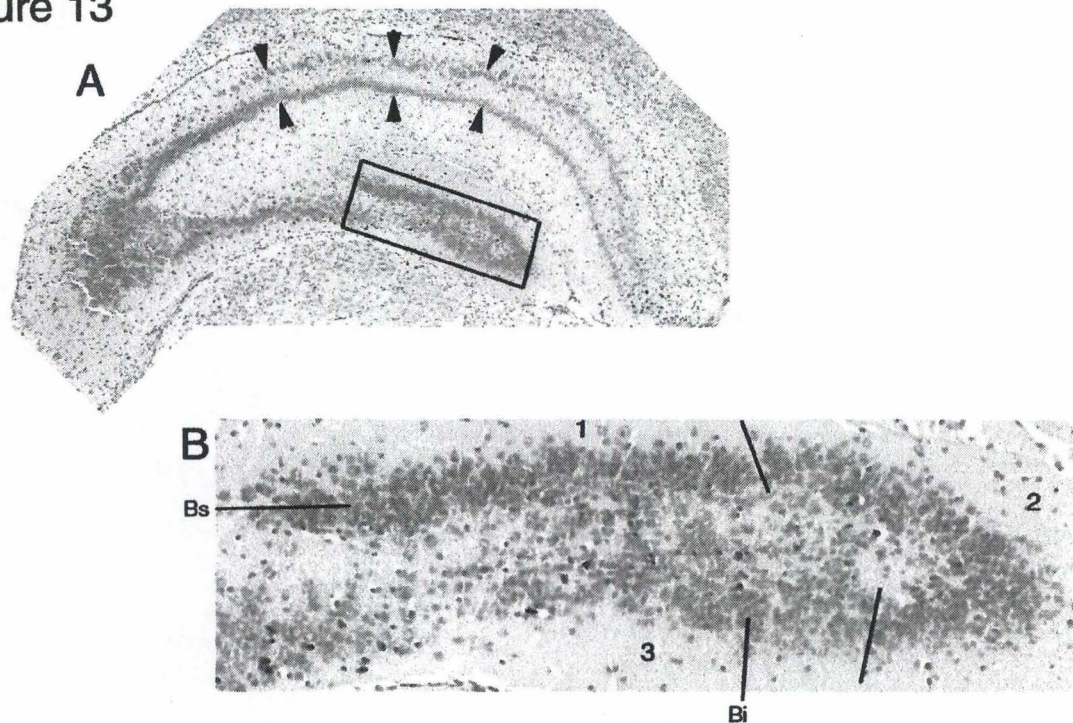


Figure 13 : coupe coronale d'hippocampe de souris ApoER2 $-/-$ VLDLR $+/-$; partie rostrale.

A : la couche pyramidale des régions CA1 et CA2 est dédoublée (têtes de flèche).

B : agrandissement du gyrus denté subdivisé en trois niveau d'organisation. Bs : bras supérieur ; Bi : bras inférieur ; 1, 2 et 3 se rapportent aux 3 niveaux d'organisation du gyrus.

Figure 14

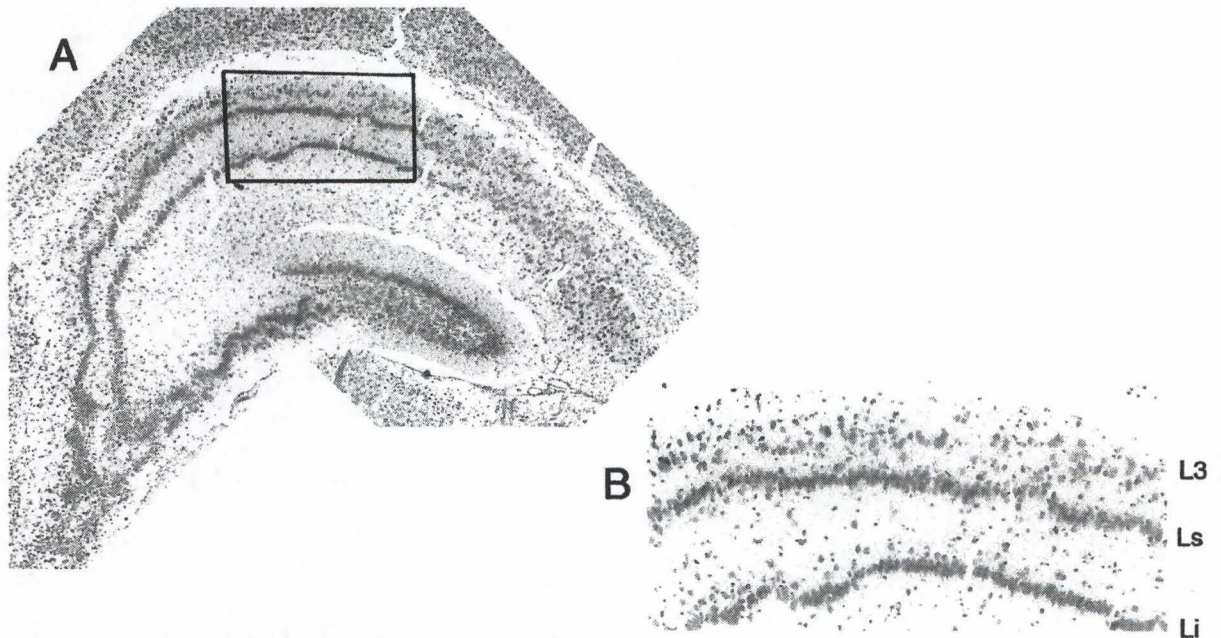


Figure 14 : coupe coronale d'hippocampe de souris ApoER2 $-/-$; partie caudale. A : la couche pyramidale est dédoublée sur toute sa longueur.

B : agrandissement d'une partie de la région CA1 ; la couche pyramidale y est détriplée. Li : ligne inférieure ; Ls : ligne supérieure ; L3 : 3^{ème} ligne (floue).

2.2 L'hippocampe chez les souris ApoER2 -/- VLDLR +/-.

Les anomalies chez ces souris sont très **semblables** aux précédentes, et même légèrement accentuées, mais aucun nouveau caractère remarquable n'apparaît.

Dans la partie **rostrale**, au début de la région **CA1**, les deux couches ont une épaisseur égale de deux ou trois cellules environ (figure 13A : têtes de flèche). A la fin de la région **CA1** et dans la région **CA2**, l'épaisseur de la couche supérieure diminue et celle de la couche inférieure augmente. Cette couche supérieure disparaît dans la région **CA3** à cause d'un nombre de cellules diminuant et de leur répartition de plus en plus irrégulière. Dans la région **CA2**, au-dessus de la couche supérieure, quelques cellules envahissent le **substance blanche**.

• Le **gyrus dentelé** se subdivise en **trois niveaux** d'organisation localisés aux mêmes endroits que dans le phénotype précédent (figure 13B) au même niveau de coupe.

◆ Le **premier niveau** d'organisation comprend la première moitié du **bras supérieur**. Les limites internes et externes de ce bras sont aussi floues l'une que l'autre.

◆ Le **second niveau** comprend l'autre moitié du **bras supérieur**, la **courbure** et le début du **bras inférieur**. La répartition cellulaire y est presque aléatoire.

◆ Dans le reste du **bras inférieur** qui forme le **troisième niveau**, les cellules se répartissent de manière tellement irrégulière que l'on ne la distingue plus des nombreuses cellules **pyramidales** et des **grains** qui ont envahi la couche **polymorphe** interne.

La **couche moléculaire** externe se démarque de la couche **granulaire** démarque par le peu de cellules qu'elle contient.

• Dans des coupes effectuées dans la partie **caudale**, la répartition des cellules dans la région **CA1** est irrégulière (figure 14A). A la fin de cette région, les cellules s'organisent pour former la couche **inférieure** et ensuite la couche **supérieure** qui subsiste jusqu'à rejoindre le **gyrus dentelé**. Dans la fin de la région **CA1** et dans la région **CA2**, une **troisième couche** est formée par les cellules **pyramidales** au-dessus de la couche supérieure. Elle est irrégulière, discontinue, et contient peu de cellules. A proximité du **gyrus**, l'organisation cellulaire diminue, de sorte qu'il devient difficile de distinguer les deux couches.

A ce niveau de coupe, les **trois niveaux** d'organisation du **gyrus** se retrouvent. Leur **localisation** est la même que celle décrite au phénotype précédent pour la partie **caudale**, et le **bras inférieur** y est tout aussi **réduit**. Leurs caractéristiques par contre sont propres au génotype et sont celles décrites ci-dessus

Figure 15

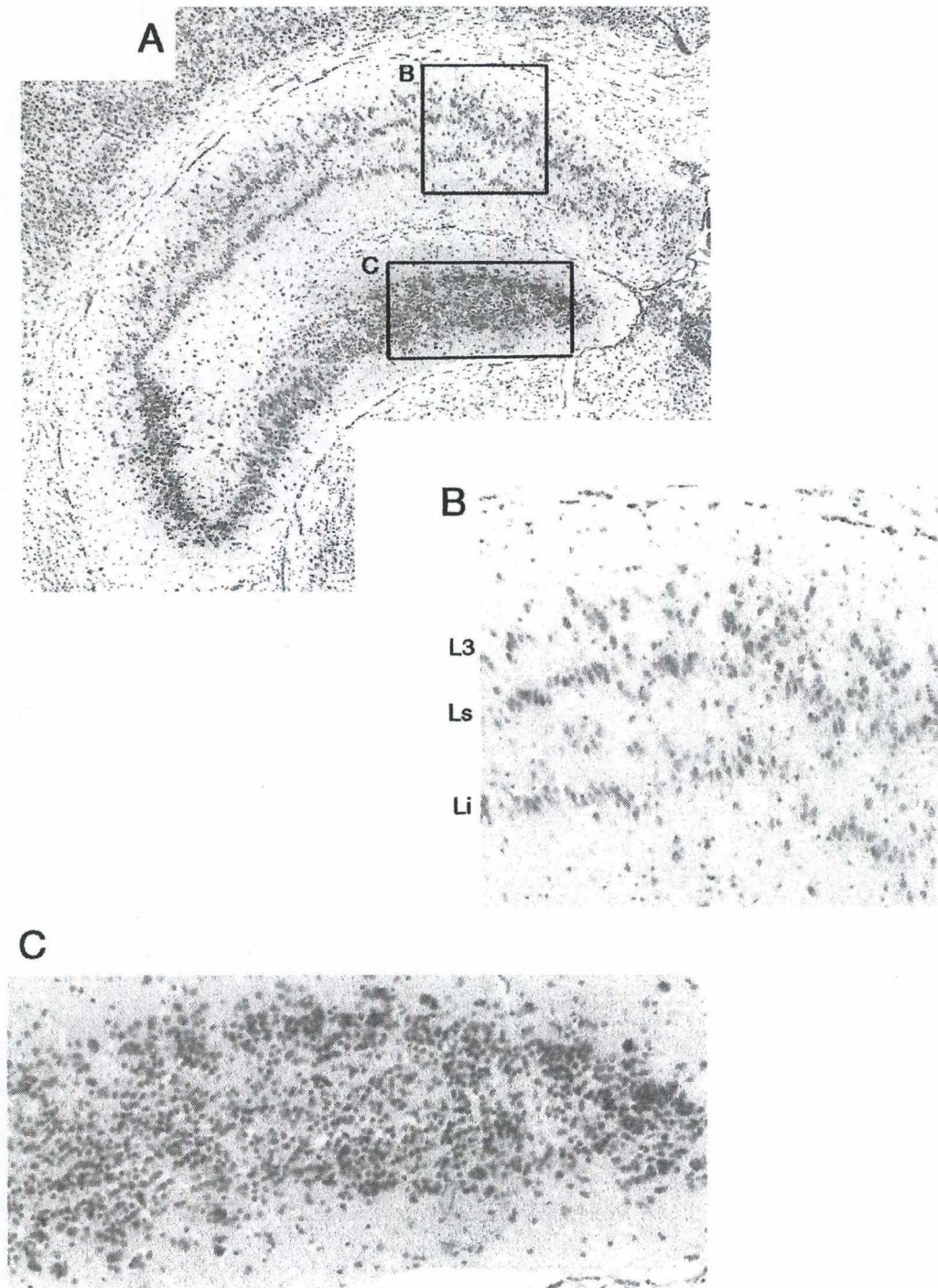


Figure 15 : coupe coronale d'hippocampe de souris VLDLR $-/-$ ApoER2 $-/-$; partie caudale

A : hippocampe complet. Le pattern des cellules pyramidales est peu reconnaissable.

B : agrandissement d'une partie de la région CA1. La couche pyramidale est détriplée.

Li : ligne inférieur ; Ls : ligne supérieur ; L3 : 3^{ème} ligne.

C : agrandissement du gyrus denté. Les grains ne présentent aucun signe d'organisation.

2.3 L'hippocampe chez les souris mutantes VLDLR -/- ApoER2 -/-.

☛ Chez ces mutants, l'hippocampe est complètement **désorganisé**. Dans la première partie de la région **CA1**, les cellules pyramidales se répartissent de manière aléatoire dans la **substance blanche** et la couche **moléculaire**. Dans la seconde partie de cette région, les cellules adoptent un pattern légèrement plus organisé. On y distingue une couche **inférieure** ondulée d'une épaisseur de deux à quatre cellules. La couche **supérieure** apparaît floue et discontinue. Au-dessus, quelques cellules forment une **troisième couche** assez vague.

☛ Les cellules de la région **CA2** ont l'organisation la plus régulière. La couche **inférieure** n'ondule plus, et les cellules **pyramidales** de la couche **supérieure** s'alignent mieux. Dans la région **CA3**, les cellules se disposent de nouveau avec un manque d'organisation évident, mais leur organisation devient plus régulière dans la **courbure**. Après la **courbure**, l'organisation des cellules diminue de nouveau.

☛ L'organisation du **gyrus dentelé** est tout aussi **anormal**. Elle est cependant homogène et n'est pas subdivisée en trois niveaux. Le **gyrus** est formé d'un gros **amas de grains** de la taille de la fourche normalement formée. La couche **moléculaire** s'en distingue par le peu de cellules qu'elle contient, mais on y observe un nombre de **grains ectopiques** anormalement élevé.

Figure 16

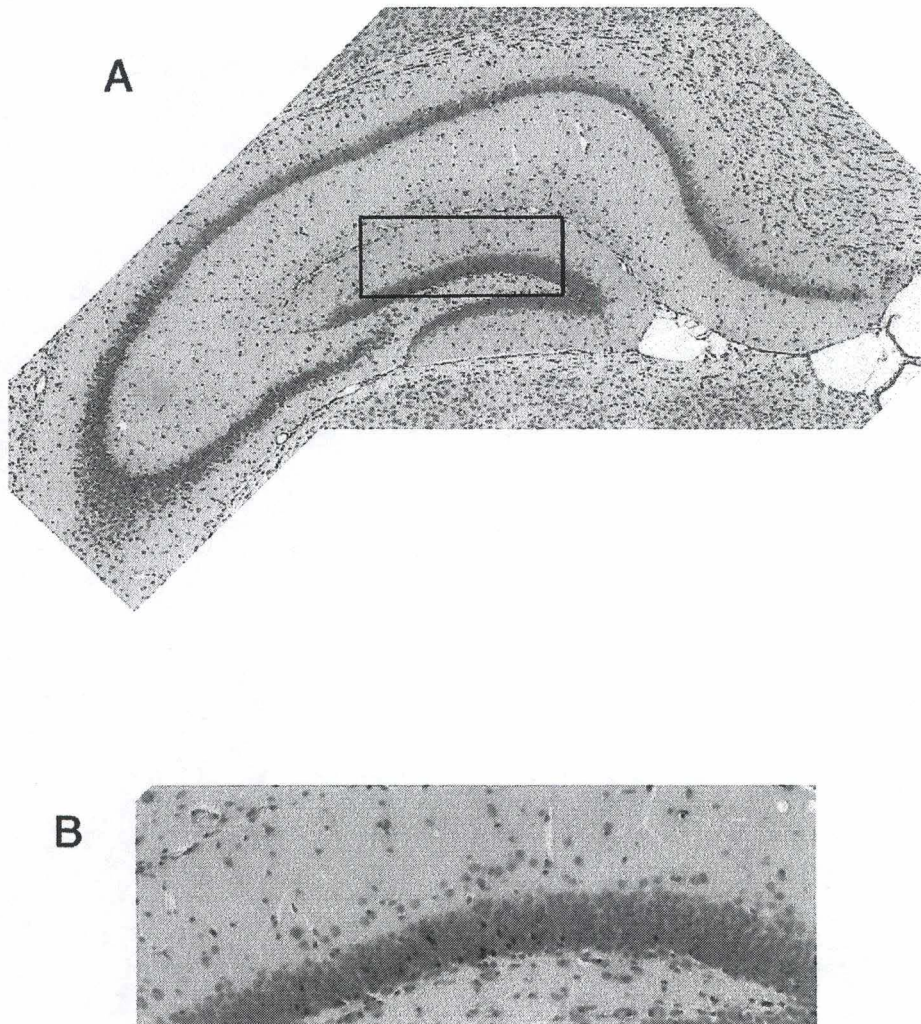


Figure 16 : coupe coronale d'hippocampe de souris VLDLR $-/-$ ApoER2 $+/-$; partie caudale.

A : hippocampe complet : les cellules pyramidales forment une monocouche régulière

B : agrandissement d'une partie du gyrus dentelé (encadrée en A). La couche moléculaire contient quelques grains ectopiques.

2.4 L'hippocampe chez les souris mutantes VLDLR -/- et VLDLR -/- ApoER2 +/-.

⊗ Chez les souris VLDLR -/-, l'**hippocampe** paraît presque **normal** quel que soit le niveau de coupe (figure 16). Cependant, deux petites anomalies résident dans le **gyrus dentelé** : la limite externe des **bras** est moins nette que la normale, et la couche **moléculaire** entourant le **gyrus** contient quelques amas de **grains ectopiques**. Ce type d'amas peu aussi s'observer chez des souris normales, mais de manière moins prononcée. Cependant, ce caractère pourrait être dû à un **effet de souche**. L'inactivation d'un allèle **ApoER2** ne produit aucun nouveau phénotype.

III. Discussion.

⊕ L'observation du cerveau des souris mutantes confirme l'importance cruciale des **récepteurs ApoER2 et VLDLR** dans le développement du **cervelet** et de l'**hippocampe**. Il apparaît que certaines **fonctions** sont **communes** aux deux récepteurs, tandis que d'autres leur sont **spécifique**.

1. Les récepteurs VLDLR et ApoER2 dans le cervelet.

◆ Dans le **cervelet**, l'inactivation d'un **récepteurs** ou de l'autre induit des anomalies développementales. Ces anomalies sont **plus fortes** chez les mutants **VLDLR -/-** que chez leurs congénères **ApoER2 -/-**.

1.1 Le cervelet chez les souris mutantes pour les deux récepteurs.

● L'effet le plus dramatique de la **double mutation** sur le cervelet est la **réduction de sa taille** et l'**absence de foliation**. Les cellules de **Purkinje** forment des **amas ectopiques** loin de la couche **granulaire**. Bien que la plupart des **grains** soient correctement positionnés, leur nombre est fortement **réduit**.

● Ce cervelet **atrophie** et **non folié** est la conséquence de la forte diminution du nombre de **grains** et de l'incapacité pour la majorité des cellules de **Purkinje** d'accomplir leur **migration**. La non migration des cellules de Purkinje semble due à leur incapacité à répondre aux **substances migratoires** de leur environnement. En conséquence, les grains dont la prolifération dépend des cellules de Purkinje n'ont pas proliféré (M. Trommsdorff et al. 1999).

● La **foliation** est sous dépendance de la **Reelin** que produisent les **grains**. Des études *in vitro* ont montré que les cellules de **Purkinje** s'alignent là où la concentration en **Reelin** est la plus forte (T. Miyata et al. 1997). Ceci indique que ce sont les **grains** qui par leur position lorsqu'ils sécrètent la **Reelin**, déterminent le **pattern de foliation**. Dans la mesure où les cellules de **Purkinje** sont incapable de percevoir le signal **Reelin**, elles ne peuvent s'aligner où sa concentration est maximale.

● Dans le **cervelet des doubles mutants**, une partie des **grains** se trouvent répartis dans la **substance blanche**. Ces **ectopies** pourraient s'expliquer par la volonté des grains à migrer sous la **couche de Purkinje** comme elle devraient le faire pour former une couche **granulaire** normale.

● Le **phénotype** affectant ces souris est fort semblable à celui affectant le **cervelet des souris reeler** ou **scrambler** (déficience pour **Dab-1**). Pour ces dernières cependant, le nombre de **grains** et de **cellules de Purkinje** est moindre, ce qui se traduit par une **taille du cervelet** inférieure par rapport aux souris **reeler** (D. Goldowitz et al. 1997). Cette différence de taille peut être due à la **surexpression de Dab-1** qui induirait un **signal basal**. Ceci indiquerait que la **Reelin**, ses deux récepteurs et **Dab-1** sont des composants obligés d'une voie de **signalisation verticale**.

1.2 Rôles communs des récepteurs.

● Chez les souris mutantes pour un seul des récepteurs, on observe des caractéristiques communes. Il s'agit d'abord **cellules de Purkinje** à proximité des **noyaux cérébelleux profonds**. Ces cellules n'ont pas été capable de s'éloigner de l'endroit où elles ont été générées (figure 3B et 6B).

● Il y a ensuite les **traînées** que ces cellules forment dans la **substance blanche**. Ces **traînées**, orientées dans le sens des fibres, résultent de l'incapacité qu'on eu les cellules à parachever leur migration. Elles se trouvent dans les zones **profondes** chez les souris **ApoER2 -/-** et dans des zones plus **superficielle** chez leurs congénères **VLDLR -/-** (figure 3A et 6B).

● Chez les souris ne possédant qu'un seul **allèle** fonctionnel de **VLDLR** ou **ApoER2**, on observe une **foliation incomplète** et anormale, caractérisée par l'**invagination** de certains lobes. Ces invaginations sont plus nombreuses chez les **VLDLR -/- ApoER2 +/-** (figure 4A-C et 7A).

● Ces données indiquent que, lors du développement du cervelet, la **fonction** de ces **récepteurs se recoupe** en partie. Cependant, les souris mutantes pour **VLDLR** sont plus touchées que leurs congénères **ApoER2 -/-**, ce qui montre l'**importance** prédominante de **VLDLR** lors du **développement cérébelleux**.

1.3 Rôles distincts des récepteurs.

● Au vu des **phénotypes variables** observés chez les différents mutants, il paraît évident que ces **récepteurs ont des rôles distincts** en plus de leurs rôles communs.

✕ Chez les souris **reeler** les cellules de **Purkinje** migrent sur une courte distance (D. S. Rice et T. Curran, 2001). La voie de signalisation **Reelin** n'intervient donc **pas** dans l'**initiation** de la migration, mais elle l'**entretient**.

✕ Dans un cervelet **ApoER2 -/-**, les **cellules de Purkinje** ectopiques se trouvent à proximité des **noyaux profonds** (figure 6A). Dans un cervelet **VLDLR -/-** où **ApoER2** est **fonctionnel**, les cellules de **Purkinje** ectopiques se trouvent à proximité du **cortex** (figure 2A-B et 3A-B).

✕ Chez les souris **ApoER2 -/- VLDLR +/-**, la répartition des cellules de **Purkinje** dans les zones profondes rappelle les "**Purkinje cell mass**" observés chez les souris **reeler** (figure 7A-B). Par opposition, on n'observe peu de cellules de **Purkinje** dans les zones profondes des souris **ApoER2 +/- VLDLR -/-** (figure 4A).

● Ces observations indiquent que **ApoER2** semble avoir une importance prédominante dans l'entretien de la migration.

✕ Chez les souris **VLDLR -/-**, les cellules de **Purkinje** envahissent considérablement la couche **granulaire** (figure 2B et 3B). Elles n'ont pas réussi à passer outre pour s'aligner derrière. Ce caractère ne se retrouve pas chez les souris **ApoER2 -/-**, chez qui les quelques problèmes d'alignement supposés pourraient être dû à l'incidence de coupe.

✕ Chez les souris **ApoER2 +/- VLDLR -/-** (figure 4A-B), on observe que les amas de cellules de **Purkinje** formés dans la **substance blanche** sont adjacents à la couche **granulaire**. Ces cellules ont donc initié leur migration qui fut correctement entretenue, mais se sont arrêtées juste avant la couche **granulaire**. Elles n'ont pas pu la traverser pour s'aligner derrière. Cette caractéristique ne s'observe pas chez les souris **ApoER2 -/- VLDLR +/-** (figure 6A), et très peu chez leurs congénères **ApoER2 -/- VLDLR +/-**.

● Ceci indique que **VLDLR** agit principalement en fin de migration et permet l'alignement des cellules.

● Dans le **cervelet**, la **Reelin** est sécrétée à partir de **E13,5** par deux types de cellules : les cellules **nucléaires** et les **grains**. Les précurseurs des cellules de **Purkinje**, générées entre **E11** et **E13**, sont donc soumises à deux sources distincts de **Reelin** qui leur permettront de former une couche bien définie à **E16,5**. Il est vraisemblable que la **Reelin** produite par les cellules **nucléaires** entretient la migration des cellules de **Purkinje**, tandis que la **Reelin** produite par les **grains** aide les cellules de **Purkinje** à former une **monocouche** là où sa concentration est la plus forte (D. Rice et Curran, 2001).

1.4 Comment ces récepteurs peuvent-ils avoir des rôles communs et d'autres spécifiques ?

◆ Plusieurs données indiquent que la **fonction commune des récepteurs** est liée à la protéine adaptatrice **Dab-1**.

■ Les souris *scrambler* (déficiante pour **Dab-1**) présentent des caractéristiques cérébelleuses fort semblable à celles observées chez les souris *reeler* et **ApoER2 -/- VLDLR -/-** (M. Trommsdorff et al. 1999).

■ Il est prouvé que **Dab-1** lie les récepteurs **LDL**, et qu'elle possède des sites de **phosphorylation** spécifiquement induit par la **Reelin** (L. Keshvara et al. 2001).

■ On observe une **augmentation** de la concentration de cette protéine aussi bien chez les souris *reeler* que chez les différents mutants pour les deux récepteurs (M. Trommsdorff et al., 1999).

◆ Dans un cervelet **ApoER2 -/-** où la majorité des cellules de **Purkinje** ont correctement migré (figure 6A), l'**augmentation** de concentration de la protéine **Dab-1** pourrait amplifier le signal **Reelin** perçu par **VLDLR**, ce qui expliquerait comment la **migration** des cellules de **Purkinje** a été **entretenu**.

Chez les souris **VLDLR -/-**, le même phénomène pourrait expliquer comment certaines cellules ont correctement **finalisé** leur **migration** (figure 2A et 3A).

◆ Les **rôles spécifiques** ne sont pas dû à une différence dans les propriétés de **liaison** de la **Reelin** à ses **récepteurs**, car des travaux ont montré d'une part que l'**affinité** des deux **récepteurs** pour la **Reelin** est **semblable** (G. D'Arcangelo et al., 1999), et d'autre part que le **domaine de liaison** de la **Reelin** à ces **récepteurs** est le même, à savoir la région centrale contenant les **domaines trois à six** (communication personnelle, Y. Jossin).

◆ Toutes les études sur le **pattern d'expression** des deux récepteurs ont été effectuées par **hybridation in situ**. Cette technique permet de visualiser la **transcription** d'un gène en **mRNA**, mais ne rend pas compte de l'**expression** de la protéine. Il existe d'une part une **régulation** au niveau de la **traduction** du mRNA en **protéine**, et d'autre part une **régulation** au niveau de sa **dégradation**.

◆ On peut estimer que dans une cellule, lorsqu'un **gène** est **transcrit** en **mRNA**, il sera **traduit** en **protéine**. Cependant, le **taux d'expression** de la protéine peut fortement varier sans pour autant que la **transcription** du gène en **mRNA** n'augmente. Un exemple remarquable est celui de la protéine **Dab-1**, dont l'expression est **13 fois** plus élevée chez les souris *reeler* que chez les souris normal, sans qu'une augmentation de la concentration en **mRNA** n'ait été mise en évidence. Cette **surexpression** peut être due soit à une augmentation de la **traduction**, soit à une diminution de la **dégradation** dont la **Reelin** serait responsable.

◆ Un **anticorps** dirigé contre **ApoER2** fut récemment produit et caractérisé au laboratoire, et un **anticorps** dirigé contre **VLDLR** est en cours de caractérisation. Ces anticorps devraient permettre de déterminer précisément **quand** et **où** chacun de ces **récepteurs** est exprimé dans le **cervelet**. Le **pattern d'expression** des deux récepteurs pourraient être en partie responsable de leurs **rôles spécifiques**.

◆ D'autres facteurs pourraient expliquer les **rôles spécifiques**.

■ *In vitro*, la **Reelin** induit la **phosphorylation** de **Dab-1** sur deux sites spécifiques : la tyrosine **198** et la tyrosine **220** (L. Keshevara et al., 2001) Il est possible ces **sites** de phosphorylation de **Dab-1** soient **spécifique** du **récepteur** qu'il lie.

■ Alternativement, **d'autres molécules** pourraient intervenir **spécifiquement** en fonction du **récepteur** liant la **Reelin**.

■ De plus amples information sont nécessaire pour émettre une hypothèse valable.

2. Les récepteurs ApoER2 et VLDLR dans l'hippocampe.

◆ Dans l'**hippocampe**, la mutation du gène **VLDLR** n'entraîne pas de phénotype particulier. Par contre, la mutation du gène **ApoER2** a un **effet marqué** sur la **lamination** qui rappelle celui observé chez les souris *reeler*. Cependant, seul les **doubles mutants** ont des caractéristiques comparables à celles observée chez les souris *reeler* ou *scrambler*.

2.1 La mutation de VLDLR ne s'exprime qu'en absence de récepteurs ApoER2 fonctionnels.

● Chez les mutants **VLDLR -/-** et **VLDLR +/- ApoER2 +/-**, l'hippocampe ne présente aucune anomalie, ce qui pourrait faire croire que **VLDLR** n'a qu'une importance négligeable dans la formation de l'hippocampe. Cependant, chez les souris **ApoER2 -/-**, les anomalies se marquent d'autant plus que la dose **VLDLR** diminue de deux **allèles** fonctionnels (dose maximale) à zéro (dose minimale) : la mutation de **VLDLR** ne provoque d'anomalie développementale qu'en absence de **ApoER2** fonctionnel.

● Ce phénomène peut s'expliquer de différentes manières.

✕ Il est possible que **ApoER2** soit capable d'interpréter le signal normalement transmis par **VLDLR**, mais que ce dernier ne soit pas capable d'interpréter le signal transmis par **ApoER2**. Cette hypothèse suppose un **point commun** entre les deux récepteurs, et le candidat le plus attractif est la protéine adaptatrice **Dab-1**.

✕ Alternativement, **VLDLR** pourrait n'interagir qu'avec des **molécules communes** aux deux récepteurs, tandis que **ApoER2** interagirait aussi avec des **molécules** qui lui sont **propres**.

2.2 La Reelin est nécessaire à la formation du gradient " inside-out " dans l'hippocampe.

• L'**hippocampe** est une structure **laminaire** qui résulte d'un processus de formation complexe. Au stade précoce de son développement (**E13-E14**), l'**hippocampe** est formé d'une couche **plexiforme** primitive qui contient les première cellule de la future couche **moléculaire**. Il s'agit entre autre des cellules de **Cajal-Retzius**. Cette couche est séparée vers **E15** par l'insertion de cellules **pyramidales** se répartissant selon un gradient " **inside-out** ". La partie supérieur de la formera le **substance blanche** tandis que la partie inférieur formera la couche **moléculaire** (K. Nakajima et al. 1997).

• Vers **E15**, le signal **Reelin** est localisée dans la couche **marginale** externe (future couche **moléculaire**) de l'**hippocampe** propre et dans la zone **marginale** du **gyrus** (future couche **moléculaire** du **gyrus dentelé**) (K. Nakajima et al. 1997).

• Dans le **cortex cérébral**, la mutation de **ApoER2** entraîne une inversion partielle du gradient **inside-out** habituelle, et cette inversion est totale chez les souris **reeler** et **double mutantes** (Trommsdorff 1999). D'autre part, on observe aussi une inversion du gradient **inside-out** de la couche **pyramidale** de l'**hippocampe** chez les souris **reeler** (K. Nakajima et al. 1997). Il est possible que cette inversion s'observe partiellement chez les souris **ApoER2 -/-**, et complètement chez les **doubles mutants**. Une étude sur le sujet pourrait montrer que **ApoER2** est nécessaire à la formation du gradient " **inside-out** ".

• Dans l'**hippocampe**, les deux récepteurs sont exprimé à **E13,5**, donc avant l'apparition des cellules **pyramidales** générées vers **E15-E16** (M. Trommsdorff et al. 1999). **ApoER2** a une expression plus large que **VLDLR**. Il est possible que la **Reelin** induise la division de la couche **plexiforme** vers **E15** (K. Nakajima et al. 1997), éventuellement grâce à **ApoER2**, et que cette division soit nécessaire à la formation du gradient **inside-out**.

• Alternativement, ce gradient pourrait être dépendant du détachement des cellules de leur fibre **gliale**. En effet, il est prouvé que la **Reelin** induit le **détachement** des cellules corticales de leur guide glial en liant l'**intégrine $\alpha 3 \beta 1$** . On observe d'ailleurs chez les souris *reeler* l'apposition permanente des cellules corticales sur les cellules **gliales** (L. Dulabon et al., 2000). Il serait intéressant de savoir si cette apposition permanente s'observe chez les différents mutants. Si c'est le cas, cela concernerait probablement les mutant **ApoER2** $-/-$. Cela impliquerait la formation d'un complexe par ce(s) **récepteur(s)** et l'**intégrine $\alpha 3 \beta 1$** indispensable à la transduction du signal **Reelin**.

2.3 Rôles des récepteurs.

♦ Les deux **récepteurs** sont exprimés dans les cellules **pyramidales** (S. Rice et Curran 2001 ; A. E. Clatworthy et al. 1999). L'**hippocampe** des souris **ApoER2** $-/-$ présentent un grand nombre de cellules qui n'ont migré que sur une très courte distance (figure 12B :couche supérieur et troisième couche). Cette observation est en accord avec l'hypothèse d'une fonction "**entretien de la migration**" pour **ApoER2** déjà évoquée plus haut.

♦ Dans la mesure où le phénotype résultant de la mutation de **VLDLR** est masqué par la présence d'au moins un allèle fonctionnel de **ApoER2**, il est peu aisé d'émettre une hypothèse quant à sa fonction dans la formation de l'**hippocampe**. Cependant la répartition de moins en moins précise des cellules **pyramidales**, mais surtout la désorganisation progressive du **gyrus dentelé** chez les mutants possédant des doses décroissantes de **VLDLR** indiquent que ce récepteur a un rôle se manifestant plutôt en **fin de migration**.

2.4 Les trois niveau d'organisation du gyrus.

Il est difficile dans l'état actuel de nos connaissance de comprendre l'origine de ces différent **niveaux** d'organisation. Il est possible que dans chacun de ces niveaux, un des **récepteurs**, voir les deux, soient exprimés à trois concentrations différentes correspondant au trois niveaux d'organisation. Ceci pourra facilement être vérifié par **immuno-localisation**. Alternativement, cette différence d'expression supposée pourrait s'observer pour une ou plusieurs autres molécules intervenant dans la voie de signalisation **Reelin**.

3. Conclusion

3.1. Importance de VLDLR et ApoER2 dans la formation du cerveau.

■ Ce travail montre que deux récepteurs de surface, **ApoER2** et **VLDLR**, sont requis pour la **migration** radiale dans le cerveau. En l'absence de ces récepteurs, la **lamination hippocampale** est aberrante et le **développement cérébelleux** n'arrive pas à terme du fait de l'incapacité des cellules de **Purkinje** à migrer.

■ Le phénotype des **doubles mutants** est fort semblable à celui observé chez les souris *reeler* ou *scrambler*, deux mutations naturelles dans lesquelles le gène **Reelin** et **Dab-1**, respectivement, sont déficient (M. Trommsdorff et al.,1999).

3.2. Rôle des récepteurs dans la migration.

• L'analyse des mutants possédants différentes **doses** de récepteurs à **Reelin** montre que **ApoER2** et **VLDLR** ont des **rôles communs** très probablement lié à la protéine **Dab-1**, et d'autres qui leurs sont **spécifique**.

• **ApoER2** semble avoir un rôle prédominant dans le **maintient de la migration** après qu'elle ai été initiée par un mécanisme encore inconnu. Il pourrait aussi jouer un rôle important dans la formation du gradient " **inside-out** " qui caractérise la **plaque corticale** et la couche **pyramidale** de l'**hippocampe**.

- **VLDLR** semble intervenir en **fin de migration**, dans l'alignement des cellules. Cette spécificité d'action pourrait être due au **pattern d'expression** des deux récepteurs et/ou à la **spécificité** des molécules avec lesquelles interagissent.

3.3. Rôle des récepteurs dans le cervelet et l'hippocampe.

- **VLDLR** a une importance prédominante dans la formation du **cervelet**. Ceci peut s'expliquer par un **taux d'expression** de **VLDLR** supérieur par rapport à **ApoER2** dans le cervelet.

- **ApoER2** a une importance prédominante dans la formation **hippocampale**. A l'inverse de ce qu'on observe dans le **cervelet**, son **expression** est supérieure à celle de **VLDLR**.

- Le **taux d'expression** de ces deux **récepteurs** pourrait expliquer leur **importance relative** dans les deux structures. Alternativement, ces récepteurs pourraient avoir des **fonctions différentes** dans le **cervelet** et l'**hippocampe**.

IV. Matériels et méthodes.

1. Génotypage des animaux.

Les souris dont les gènes VLDLR et ApoER2 ont été inactivés par recombinaison homologue ont été produites par le laboratoire de J. Herz (Dallas). Les mutants VLDLR ont été obtenus du Jakcon Laboratory qui en assure la distribution, et les mutants ApoER2 ont été fournis directement par le laboratoire de J. Herz. Ces mutants sont pratiquement indemnes, de sorte qu'il n'est pas possible de distinguer à l'examen externe les individus normaux, hétérozygotes et homozygotes. Il est donc nécessaire de réaliser un génotypage par PCR à partir d'ADN génomique extrait par prélèvement d'un morceau de la queue.

Les fragments de queue d'une longueur de environ 1 cm sont prélevés le plus proprement possible (rinçage de la queue et des ciseaux à l'éthanol 70 % et prélèvement dans un Eppendorf stérile). 150 μ l d'une solution de protéinase K (Tris-HCl pH 8 100mM, EDTA pH 8 1mM, NaCl 100mM, SDS 1%, protéinase K 100 μ g/ml) est ajouté et l'incubation est poursuivie "overnight" à 55 °C. L'ajout de 75 μ l de phénol et 75 μ l de CIAA dans les lysats permet d'isoler l'ADN qui se trouve alors dans la phase aqueuse. La PCR se fait sur 2 μ l de cette phase diluée 20 fois.

Les amorces et conditions de PCR sont les suivantes :

Pour le gène VLDLR :

Amorces :-PF14 et PF110 pour l'allèle WT (650 bp)

-SI75 et PF4 pour l'allèle KO (1200 bp)

PF14 : 5'-TCATCGCTGGCGGCCTTGGAGTCA-3'

PF110 : 5'-TGGTGATGAGAGGCTTGTATGTTGTC-3'

SI75 : 5'-GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGC-3'

PF4 : 5'-CCCTGGAGAAAATCTGCGGGTTAAATA-3'

PCR :-solution

DNA genomique : 1 μ l
DNTP 10 mM : 0,5 μ l
10x PE w/MgCl₂ : 2 μ l
Primer mix (10 μ M; WT ou KO) : 1 μ l
Taq polymerase : 0,15 μ l
H₂O : 15,35 μ l

-Programme

1. 95°C, 30 sec
2. 94°C, 30 sec
3. 65°C, 30 sec
4. 72°C, 1 min
5. 35 cycles jusque 2.

Pour le gène ApoER2 :

Amorces : WT-1 et MT14 pour l'allèle WT (520 bp)

SI75 et KO rev-1 pour l'allèle KO (420 bp)

WT-1 : 5'-CCACAGTGTACACAGGTAATGTG-3'

MT14 : 5'-ACGATGACCCCAATGACAGCAGCG-3'

SI75 : 5'-GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGC-3'

KO rev-1 : 5'-GCTTGTGGAATTCAGCCAGTTAC-3'

PCR :-solution

DNA genomique : 1 μ l
DNTP 10 mM : 0,5 μ l
10x PE w/MgCl₂ : 2 μ l
Primer mix (10 μ M; WT ou KO) : 1 μ l
Taq polymerase : 0,15 μ l
H₂O : 15,35 μ l

-Programme

1. 98°C, 40 sec
2. 98°C, 20 sec
3. 65°C, 30 sec
4. 72°C, 90 sec
5. 35 cycles jusque 2.
6. 72°C, 10 min

8 μ l des produits PCR auxquels sont ajouté 12 μ l de "bleu" ??? sont mis sur un gel d'électrophorèse (agarose 1% préparé dans du TBE), une piste par gène et par allèle testé.

Un exemple est donné à la figure Xxx.

2. Animaux.

Les animaux contenant des doses différentes des deux allèles mutants ont été engendrés au laboratoire par croisement des simples mutants. Pour notre travail, nous avons examiné :

- 1 souris double KO VLDLR -/- et ApoER2 -/-
- 3 souris VLDLR -/- et ApoER2 +/-
- 3 souris VLDLR +/- et ApoER2 -/-
- 1 souris VLDLR +/- et ApoER2 -/-
- 1 souris VLDLR -/- et ApoER2 +/-
- 1 souris contrôle normale

Sous anesthésie à l'éther, les animaux sont perfusés par voie intracardiaque, via le ventricule gauche, avec une solution de formaldéhyde (10% dans l'eau). Les cerveaux sont prélevés dès la fin de la perfusion, puis fixés une nuit dans du formaldéhyde 10% à 4°C, rincés au PBS, puis débités en blocs avant d'être enrobés en paraffine.

Quatre cerveaux de poulets : deux normaux (marqué PN) et deux VLDLR -/- (marqué PR) ont été fournis par J. Nimpf (Université de Vienne). Ils avaient été préalablement fixés et enrobés en paraffine.

3. Préparation, coloration et marquage immunohistochimique des coupes.

Les blocs en paraffine sont dégrossis, puis des sections semi-sérialisées de 10 microns d'épaisseur sont coupées au microtome et montées, l'intervalle entre chaque niveau étant de l'ordre de 100 à 150 microns. Les coupes sont collées sur des lames Superfrost, à 40 °C avec de l'eau gélatinée (0,1g/l).

Après avoir été déparaffinées par trois bains successifs d' " histoclear " et hydratées successivement en butanol, alcool 100%, 95%, 70%, puis eau. Les séries de coupes sont colorées par le violet de crésyl, selon la méthode de Nissl, et montées.

Les cellules de Purkinje ont été mises en évidence par un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la Calbindin 38K (Swant, Bellinzona).

4. Micrographies et traitement d'images.

Les coupes ont été numérisées par la caméra « axiocam » supportée par le logiciel « Axiovision 2.0 » tout deux fourni par « Carl Zeiss ». Comme, avec ce matériel, le champs de vision est étroit, les micrographies à faible grossissement ont été prises en plusieurs fois. Il s'agit des micrographies colorées au Crésyl. Les micrographies ont été assemblées et traitées par le logiciel « photoshop 5.0 ».

Remerciement

■ Je tiens à remercier toute l'équipe du département de Neurobiologie pour leur soutien, en particulier le Dr A. Goffinet (mon promoteur), le Dr C. Lambert (ma co-promotrice) et Dr I. Bar pour leurs conseils, ainsi que le futur Dr Y. Jossin pour ses communications et pour m'avoir laissé réquisitionner son PC et sa chaise de bureau.

■ Je remercie également Mr Herin pour ses explications sur la numérisation des images et pour sa coopération lors de leur transfert.

■ Un grand merci à toute ma famille pour leurs encouragements, en particulier le Dr H. Dejardin (mon papa) et Mme C. Naômé (ma tante) pour l'intérêt porté à mon travail et pour leur conseil.

■ Je remercie aussi M. Gilson (un ami) pour ses conseils de mise en page.

V. Bibliographie.

- ✦ I. Bar, C. Lambert de Rouvroit, et A. M. Goffinet (2000) The Reelin-signaling pathway and mouse cortical development. Results and problems in cell differentiation 30.
- ✦ M. Trommsdorff, M. Gotthardt, T Hiesberger, J Shelton, W Stockinger, J Nimpf, R. E. Hammer, J. A. Richardson, et J. Herz (1999). Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. Cell 97 : 689-701.
- ✦ C. A. Walsh et A. M. Goffinet (2000). Potential mechanisms of mutations that affect neuronal migration in man and mouse. Current opinion in genetics & development 10 : 270-274.
- ✦ N. Utsunomiya-Tate, K-i Kubo, S-i Tate, M. Kainosho, E. Katayama, K. Nakajima, et K. Mikoshiba (2000). Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function blocking CR-50 antibody. PNAS 97-17 : 9729-9734.
- ✦ J. Nimpf, W. J. Schneider (1998). The VLDL receptor : an LDL receptor relative with eight ligand binding repeat, LR8. Artherosclerosis 141 : 191-202.
- ✦ W. J. Shneider, J. Nimpf, et H. Bujo (1997). Novel members of the low density lipoprotein receptor superfamily and their potential roles in lipid metabolism. Current opinion in lipidology 8 : 315-319.
- ✦ G. D'Arcangelo, R. Homayouni, L. Keshevara, D. S. Rice, M. Scheldon, et T Curran (1999). Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. Neuron 24 : 471-479.
- ✦ B. W. Howell, T. M. Herrick, J. D. Hidebrand, Y. Zhang, et J. A. Cooper (2000). Dab1 tyrosine phosphorylation relay positional signals during mouse brain development. Current biology 10 : 877-885.
- ✦ B. W. Howell, F. B. Gertler, et J. A. Cooper (1997). Mouse disabled (mDab1) : a Src binding protein implicated in neuronal development. The EMBO journal 19 : 121-132.

† B. W. Hoxell, L. M. Ianier, R. Frank, F. B. Gertler, et J. A. Cooper (1999). The disabled 1 phosphotyrosine-binding domain binds to the internalization signals of transmembrane glycoproteins and to phospholipids. *Molecular and cellular biology* 19-7 : 5179-5188.

† L. Keshevara, D. Benhayon, S. Mgdaleno, et T. Curran (2001). Identification of Reelin-induced sites of phosphorylation on Disabled 1. *JBC paper in press*???

† L. Dulabon, E. C. Olson, M. G. Taglienti, S. Eisenhuth, B. McGrath, C. A. Walsh, J. A. Kreidberg, et E. S. Anton (2000). Reelin binds $\alpha 3 \beta 1$ integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27 : 33-44.

† N. Kohmura, K. Senzaki, S. Hamada, N. Kai, R. Yasuda, M. Mishina, et T. Yagi (1998). Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron* 20 : 1137-1151.

† K. Senzaki, M. Ogawa, et T. Yagi (1999). Proteins of the CNR family are multiple receptors for Reelin. *Cell* 99 : 635-647.

† T. Hiesberger, M. Trommsdorff, B. W. Howell, A. M. Goffinet, M. C. Mumby, J. A. Cooper, et J. Herz (1999). Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of Disabled-1 and modulates Tau phosphorylation. *Neuron* 24 : 481-489.

† M. Trommsdorf, J-P. Borg, B. Margolis, et J. Herz (1998). Interaction of cytosolic adaptor with neuronal Apolipoprotein E receptors and the Amyloid Precursor Protein. *The journal of biological chemistry* 273-50 : 33556-33560.

† W. J. Larsen. *Human embryology*. Ed. Churchill Livingstone 1993 : 389-395.